

17. Quinton J. F., Sendid B., Reumaux D. et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role // Gut. – 1998. – Vol. 42. № 6. – P. 788–791.

18. Schooley R. T. Epstein-Barr virus (Infectious mononucleosis) // Principles and practice of infectious diseases. – London: Churchill livingstone, Inc., 2000. – P. 1599–1613.

19. Sosroseno W., Herminajeng E., Goeno S. The interleukin network in the immunopathogenesis of oral diseases // Asian pac. allergy immunol. – 1994. – Vol. 12. № 2. – P. 161–168.

20. Wakefield A. J., Fox J. D., Sawyerr A. M. et al. Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease using the nested polymerase chain reaction // J. med. virol. – 1992. – Vol. 38. № 3. – P. 183–190.

21. Walch L. J., Davis M. F., Xu L. J. et al. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity // J. oral pathol. med. – 1995. – Vol. 24. № 6. – P. 266–272.

Поступила 13.06.2015

С. В. ЧАУСОВА¹, К. Г. ГУРЕВИЧ², Г. П. БОНДАРЕВА³, Е. Э. АРУТЮНОВА¹, И. Ю. МАЛЫШЕВ⁴

КИСЛОРОДОЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

¹Кафедра общей патологии медико-биологического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» МЗ РФ, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1; тел. 8 (495) 434-86-37. E-mail: svetlana_chau@mail.ru;

²кафедра ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни – залог успешного развития» лечебного факультета ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» МЗ РФ,

Россия, 103473, г. Москва, ул. Делегатская, 20/1. E-mail: kgurevich@mail.ru;

³отделение бронхиальной астмы ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, 115408, г. Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2; тел. (499) 618-25-26. E-mail: bondarev-galina@yandex.ru;

⁴кафедра патологической физиологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» МЗ РФ, Россия, 103473, г. Москва, ул. Делегатская, 20/1. E-mail: Iymalyshev1@mail

В работе исследовали кислородозависимый метаболизм полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЛ) периферической крови пациентов с непереносимостью нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) с различными клиническими проявлениями методами стимулированной сульфатом бария люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Выявлено нарушение окислительного метаболизма ПМЛ крови у пациентов с астматической триадой, что проявляется в снижении суммарной продукции активных форм кислорода (АФК), продукции супероксидного анион-радикала ПМЛ по сравнению со здоровыми донорами. У пациентов с хронической крапивницей, обостряющейся после приема НПВП, существенных изменений продукции АФК относительно таковой здоровых доноров не было выявлено.

Ключевые слова: полиморфно-ядерные лейкоциты, хемилюминесценция, непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов.

S. V. CHAU SOVA¹, K. G. GUREVICH², G. P. BONDAREVA³, E. E. ARUTYUNOVA¹, I. Yu. MALYSHEV⁴

OXYGEN-DEPENDENT METABOLISM OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES
IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH INTOLERANCE TO NON-STEROIDAL
ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

¹Chair of the general pathology of medical and biologic faculty Russian national research medical university, Russia, 117997, Moscow, str. Ostrovityanova, 1; tel. 8 (495) 434-86-37. E-mail: svetlana_chau@mail.ru;

²chair UNESCO «Healthy way of life – pledge successful razvutmu»

Moscow state mediko-stomatologic university of A. I. Evdokimova,
Russia, 103473, Moscow, street Delegastkaja, 20/1. E-mail: kgurevich@mail.ru;
³branch bronchial asthma institute of Immunology Moscow,
Russia, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24/2; tel. (499) 618-25-26. E-mail: bondarev-galina@yandex.ru;
⁴chair of pathological physiology of medical faculty Moscow state medical and dental university,
Russia, 103473, Moscow, street Delegastkaja, 20/1. E-mail: lymalyshev1@mail.ru

We investigated the oxygen-dependent metabolism of polymorphonuclear leukocytes (PML) in peripheral blood of patients with intolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) with different clinical manifestations with methods stimulated barium sulfate luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. Revealed the violations of oxidative metabolism PML the blood in patients with asthmatic triad, resulting in a decrease in the total production of reactive oxygen species (ROS) and production of superoxide anion radical PML compared with healthy donors. In patients with chronic urticaria, worsening after administration of NSAIDs, significant changes in ROS production relative to such a healthy donors were not identified.

Key words: polymorphonuclear leukocyte, chemiluminescence, non-steroidal anti-inflammatory drugs intolerance.

Введение

В последние годы стремительно растет количество больных, страдающих непереносимостью нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Наиболее часто непереносимость НПВП проявляется реакциями со стороны органов дыхания (аспириновая астма, ринит) или со стороны кожных покровов (крапивница/отек Квинке) [7].

Большую клиническую группу больных с непереносимостью НПВП составляют пациенты с астматической триадой (АТ). АТ характеризуется тремя основными клиническими проявлениями: бронхиальной астмой (БА), полипозным риносинуситом (ПРС) и непереносимостью НПВП. Клиническое течение АТ отличают тяжелое течение БА, малая эффективность традиционного лечения, необходимость глюкокортикостероидной терапии, эпизоды крайне тяжелых приступов удушья и случаи летального исхода [6]. Считается, что фоном для индукции непереносимости НПВП служит хроническое воспаление слизистой оболочки верхних и/или нижних дыхательных путей, в механизме которого важнейшее значение имеют эозинофилы [10]. Г. П. Бондаревой [2] выявлено разнообразие штаммов возбудителей острой и хронической инфекции дыхательных путей у всех больных АТ и доказано, что бактериальная, хламидийная, микоплазменная, вирусная и грибковая флора может быть причиной обострения не только воспаления дыхательных путей, но и основных проявлений АТ – БА и ПРС. У большинства больных АТ чаще отмечаются обострения инфекционного процесса как местной, так и системной локализации, обострения очагов хронической инфекции и наличие признаков вторичного иммунодефицитного состояния [2]. При изучении показателей иммунограммы больных с АТ существенных изменений не выявлено. Однако описаны дефицит секреторного IgA в назальном секрете, а также

наличие высоких уровней специфических иммуноглобулинов к возбудителям хронической внутриклеточной инфекции [3].

Вместе с тем, по нашему мнению, частые инфекционные осложнения у пациентов с АТ могут свидетельствовать о нарушении функциональной активности ПМЛ, в частности, способности последних к адекватному осуществлению реакций «дыхательного взрыва» при их взаимодействии с внешними факторами (например, микроорганизмами и др.). Известно, что «дыхательный взрыв» сопровождается вспышкой хемилюминесценции (ХЛ). В связи с этим ХЛ в настоящее время широко используют для оценки функционального состояния ПМЛ [4].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы явилось определение суммарной продукции АФК, продукции супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) ПМЛ периферической крови больных с непереносимостью НПВП с разными клиническими проявлениями непереносимости.

Материалы и методы

Объектом исследования были 37 пациентов (22 женщины и 15 мужчин) в возрасте от 19 до 70 лет: 21 пациент с АТ со смешанной (неинфекционно- и инфекционно-зависимой) и инфекционно-зависимой формами бронхиальной астмы (группа 1) и 16 пациентов с хронической псевдоаллергической крапивницей/отеком Квинке, обостряющейся после приема НПВП (группа 2). Все пациенты находились в фазе ремиссии основного заболевания. Критерии включения пациентов в исследование: приступы экспираторного диспноэ, ринит, крапивница, отек Квинке при приеме НПВП в любой лекарственной форме (инъекции, таблетки, драже). Критерии исключения: проявления острой или обострение хронической инфекции, прием системных глюкокортикостероидов, антибиотиков за 2 недели и менее до исследования.

Контрольная группа практически здоровых людей состояла из 24 человек (17 женщин и 7 мужчин) в том же возрастном диапазоне.

Все включенные в исследование лица дали добровольное письменное информированное согласие. Клиническое исследование одобрено Межвузовским комитетом по этике, протокол № 05-12 от 17.05.2012 г.

Для исследования использовали гепаринизированную венозную кровь объемом 1,0 мл (50 ЕД/мл), а также суспензию ПМЛ, выделенных из гепаринизированной венозной крови объемом 5,0 мл (50 ЕД/мл). Выделение ПМЛ из периферической крови производили на градиенте двойной плотности фиколл-уротраст (1,093:1,077). Непосредственно перед проведением исследования производили подсчет лейкоцитарной формулы с определением количества и жизнеспособности ПМЛ. Из образцов крови или суспензии ПМЛ отбирали объемы, содержащие 1×10^6 лейкоцитов, и доводили их до 0,7 мл средой Хенкса. Каждую пробу инкубировали в течение 45 мин. при 37°C при постоянном перемешивании. Жизнеспособность ПМЛ, определяемая окрашиванием трипановым синим, за время инкубации существенно не изменялась. После инкубации проводили измерение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) проб на 36-кюветном биолюминометре анализаторе БЛМ 3606–01 (г. Красноярск), сигнал от которого поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы «BLM- Obrab». В качестве активатора свечения использовали люминол (регистрирует суммарную продукцию АФК ПМЛ) и люцигенин (отражает количество $\text{O}_2^{\cdot-}$, продукт активности НАДФН-оксидазы ПМЛ) [4]. В кювету хемилюминометра вносили 0,7 мл пробы после инкубации и 0,15 мл активатора (2 мМ). Далее измеряли уровень спонтанной ХЛ. После регистрации спонтанной ХЛ добавляли 0,15 мл стимулятора свечения – сульфата бария (2 мг/мл) и регистрировали уровень стимулированной ХЛ. Измерение ХЛ крови проводили в режиме постоянного перемешивания при температуре 37°C . Конечный объем проб состав-

лял 1 мл. С помощью компьютерной программы «BLM-Obrab» определяли площадь под кривой ХЛ (S_{хл}), отражающую светосумму ХЛ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программ «STATISTICA», версия 7.0, и «Excel 2007». Все результаты в данной работе представляли в виде $M \pm m$ (M – среднее арифметическое для анализируемой группы показателей, m – ошибка среднего). Соответствие закона распределения нормальному устанавливали с помощью λ -критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическую достоверность отличия измеряемых величин определяли, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверно значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В первой серии опытов определяли суммарную продукцию АФК (общую фагоцитарную активность) ПМЛ цельной крови и суспензии выделенных ПМЛ методом стимулированной сульфатом бария люминолзависимой хемилюминесценции (СЛХЛ) у здоровых доноров и пациентов с непереносимостью НПВП с разными клиническими проявлениями. Для оценки суммарной продукции АФК ПМЛ регистрировали площадь под кривой СЛХЛ, отражающую светосумму свечения и прямо пропорциональную общей фагоцитарной активности ПМЛ. Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из результатов, представленных в таблице 1, у больных 1-й группы (пациенты с АТ) показатели светосуммы СЛХЛ достоверно ниже таковых у здоровых доноров как в цельной крови (ниже на 33,4%), так и в суспензии ПМЛ (ниже на 17,5%). У больных 2-й группы (пациенты с хронической крапивницей/отеком Квинке) не было выявлено существенных изменений исследуемых показателей относительно таковых у здоровых доноров.

Полученные результаты показывают, что в группе пациентов с АТ снижена суммарная продукция АФК ПМЛ крови, что может свидетельствовать о нарушении окислительного

Таблица 1

Светосумма СЛХЛ ПМЛ периферической крови доноров и больных с непереносимостью НПВП ($M \pm m$)

Исследуемые группы лиц	Светосумма СЛХЛ ПМЛ	
	ПМЛ цельной крови	Выделенные ПМЛ
Доноры	232750,9 ± 23283,1	20005759,1 ± 1200345,5
Группа 1	155020,6 ± 22307,5*	16507651 ± 990459,1*
Группа 2	251055,1 ± 18025,4	19917131,3 ± 2600718,2

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно аналогичного показателя у здоровых доноров.

метаболизма и, следовательно, функциональной активности ПМЛ. Пациенты с хронической крапивницей/отеком Квинке, обостряющейся после приема НПВП, не имеют существенных изменений суммарной продукции АФК ПМЛ по сравнению со здоровыми донорами. Более выраженное снижение суммарной продукции АФК ПМЛ цельной крови по сравнению с таковой выделенными ПМЛ у пациентов 1-й группы, вероятно, связано с супрессирующим влиянием на люминолзави-

ле продукция O_2^- ПМЛ периферической крови, зависит от основного заболевания, одним из симптомов которого является непереносимость НПВП. У пациентов с АТ выявляется снижение как суммарной продукции АФК, так и продукции O_2^- ПМЛ по сравнению со здоровыми донорами. Снижение продукции O_2^- ПМЛ косвенно свидетельствует об угнетении активности НАДФН-оксидазы ПМЛ у этих больных. У пациентов с хронической псевдоаллергической крапивницей/

Таблица 2

Светосумма СЛЦХЛ ПМЛ периферической крови доноров и больных с непереносимостью НПВП ($M \pm m$)

Исследуемые группы лиц	Светосумма СЛЦХЛ ПМЛ	
	ПМЛ цельной крови	Выделенные ПМЛ
Доноры	96803,1 ± 8586,6	874586 ± 92247
Группа 1	74151,2 ± 5343,4*	637095 ± 58963*
Группа 2	105469 ± 8601,5	850228 ± 82528

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно аналогичного показателя у здоровых доноров.

симую ХЛ ПМЛ находящихся в крови больных биологически активных веществ (медиаторов). В частности, установлено повышение в плазме крови пациентов с АТ базальных уровней медиаторов тучных клеток [9], включая биогенные амины (гистамин, серотонин), способных оказывать ингибирующее влияние на окислительный метаболизм фагоцитов [1, 5].

Во второй серии опытов измеряли продукцию O_2^- ПМЛ у больных с непереносимостью НПВП разных клинических групп методом стимулированной сульфатом бария люцигенин-зависимой ХЛ (СЛЦХЛ). Определяли площадь под кривой СЛЦХЛ, отражающую светосумму свечения и прямо пропорциональную активности НАДФН-оксидазы ПМЛ при действии стимула (табл. 2).

Как видно из данных, представленных в таблице 2, у пациентов 1-й группы наблюдается снижение светосуммы СЛЦХЛ выделенных ПМЛ (на 27%) и ПМЛ цельной крови (на 23%) по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). У пациентов 2-й группы существенных изменений СЛЦХЛ ПМЛ не было выявлено.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении продукции O_2^- ПМЛ у пациентов 1-й группы, что косвенно свидетельствует об угнетении активности НАДФН-оксидазы ПМЛ в данной группе пациентов. У пациентов 2-й группы существенных изменений продукции O_2^- ПМЛ не обнаружено.

Таким образом, у исследуемых нами пациентов суммарная продукция АФК, в том чис-

отеком Квинке, обостряющейся после приема НПВП, не обнаруживается существенных изменений продукции АФК ПМЛ по сравнению со здоровыми донорами.

Эти результаты подтверждают ранее полученные нами данные [8], согласно которым у пациентов с АТ наблюдалось снижение способности ПМЛ крови к праймингу при воздействии комплексным антигеном (АГ) *Staphylococcus aureus*, что свидетельствует о снижении функциональной активности (оксидантных функций) ПМЛ у этих пациентов. Также нами было установлено, что одним из механизмов подавления эффекта прайминга у данных пациентов является снижение активности НАДФН-оксидазы ПМЛ, возможно, связанное с нарушением сборки данного фермента в процессе предстимуляции АГ *Staphylococcus aureus* [8]. Мы склонны полагать, что нарушения оксидантных функций ПМЛ крови больных с АТ может быть связано с дефектами в работе НАДФН-оксидазы ПМЛ и, возможно, других кислородозависимых ферментных систем. Нарушения механизмов «дыхательного» взрыва в ПМЛ крови могут являться причиной частых инфекционных осложнений у больных с АТ.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований доказано, что при непереносимости НПВП суммарная продукция АФК ПМЛ периферической крови зависит от клинических проявлений непереносимости. У пациентов с астматической триадой выявляется снижение суммарной продукции АФК ПМЛ, в том

числе продукции $O_2^{\cdot-}$, по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). У пациентов с хронической псевдоаллергической крапивницей/отеком Квинке, обостряющейся после приема НПВП, не обнаруживаются существенных изменений продукции АФК ПМЛ по сравнению со здоровыми донорами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бизунок Н. А. Биогенные амины – эндогенные модуляторы клеточной генерации активных форм кислорода // Белорусский медицинский журнал. – 2004. – № 4. – С. 34–36.
2. Бондарева Г. П. Аспириновая бронхиальная астма. Клинико-патогенетические аспекты // Физиология и патология иммунной системы. – 2005. – Т. 9. № 3. – С. 5–11.
3. Бондарева Г. П. Астматическая триада // Доктор. ру. – 2010. – № 2. – С. 19–24.
4. Владимиров Ю. А., Проскурина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
5. Искусных А. Ю., Башарина О. В., Артюхов В. Г., Алабовский В. В. Влияние гистамина на функциональные свойства нейтрофилов и интенсивность процесса пероксидного окисления нейтрофилов в крови доноров // Журнал «Вестник

ВГУ». Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2008. – № 1. – С. 93–96.

6. Клиническая аллергология: Рук-во для практических врачей / Под ред. акад. РАМН, проф. Р. М. Хаитова – М.: МЕД-пресс-информ, 2002. – 624 с.

7. Пыцкий В. И., Адрианова Н. В., Артомасова А. В. Аллергические заболевания. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: издательство «Триада-Х», 1999. – 470 с.

8. Чаусова С. В., Бондарева Г. П., Усанова Е. А., Синельникова А. Н., Дмитриева Е. А., Малышев И. Ю., Гуревич К. Г. Изменение функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови у больных с астматической триадой // Медицина критических состояний. – 2014. – № 2. – С. 30–35.

9. Bochenek G., Nizankowska E., Gielicz A., Swierczynska M., Szczeklik A. Plasma $9\alpha,11\beta$ -PGF₂ and PGD₂ metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma // Thorax. – 2004. – № 59. – P. 459–464.

10. Kowalski M. L., Makowska J. S. Аспиринзависимые заболевания органов дыхания. Современные подходы к диагностике и лечению // Allergy clin. immunol. int. J. World allergy org. russ. ed. – 2007. – V. 2. № 1. – P. 12–22.

Поступила 07.05.2015