

ВКЛАД НАДФН-ОКСИДАЗЫ ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В РАЗВИТИЕ ФЕНОМЕНА ИНГИБИРОВАНИЯ СТИМУЛИРОВАННОЙ СУЛЬФАТОМ БАРИЯ ЛЮМИНОЛЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПСЕВДОАЛЛЕРГЕНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИХ НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ

© Гуревич К.Г.¹, Чаусова С.В.³, Бондарева Г.П.⁴, Филатов О.Ю.², Балякин Ю.В.³, Малышев И.Ю.²

¹ Кафедра ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни – залог успешного развития», ² кафедра патологической физиологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, Москва; ³ кафедра общей патологии, ⁴ кафедра иммунологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва

E-mail: svetlana_chau@mail.ru

Исследовали стимулированную сульфатом бария люцигенин-зависимую хемилюминесценции (СЛЦХЛ) крови после предварительной инкубации проб крови с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП), тартразином, выступающими в роли псевдоаллергенов, у пациентов с их непереносимостью и здоровых доноров. Выявлено, что практически при всех концентрациях НПВП относительная светосумма СЛЦХЛ крови больных с непереносимостью НПВП была достоверно ниже таковой здоровых доноров, что косвенно свидетельствует об угнетении активности НАДФН-оксидазы полиморфноядерных лейкоцитов крови. У пациентов с непереносимостью тартразина показатели относительной светосуммы СЛЦХЛ крови не имели достоверных отличий от таковых здоровых доноров.

Ключевые слова: хемилюминесценция, НАДФН-оксидаза, полиморфноядерные лейкоциты, непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов, непереносимость тартразина.

THE CONTRIBUTION OF THE NADPH-OXIDASE OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD TO THE DEVELOPMENT OF INHIBITION OF BLOOD STIMULATED BY BARIUM SULFATE LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE UNDER THE INFLUENCE OF PSEUDOALLERGENS IN PATIENTS WITH THEIR INTOLERANCE

Gurevich K.G.¹, Chausova S.V.³, Bondareva G.P.⁴, Filatov O.Yu.², Balyakin Yu.V.³, Malyshev I.Yu.²

¹ Department of UNESCO «Healthy lifestyle- the key to successful development», ² Department of Pathological Physiology of A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow; ³ Department of General Pathology, ⁴ Department of Immunology of N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

We investigated barium sulfate stimulated lucigenin-dependent chemiluminescence (SLCCHL) blood after pre-incubation of blood samples with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), tartrazine, acting as pseudoallergens, in patients with their intolerance and healthy donors. It is revealed that in almost all the concentrations of NSAIDs the indicators of SLCCHL blood in patients with intolerance to NSAIDs was significantly lower than those of healthy donors that indirectly indicates the inhibition of activity of NADPH oxidase of polymorphonuclear blood leukocytes. In patients with intolerance to tartrazine the indicators of SLCCHL blood had no significant differences from those of healthy donors.

Keywords: chemiluminescence, NADPH-oxidase, polymorphonuclear leukocytes, non-steroidal anti-inflammatory drugs intolerance, tartrazine intolerance.

В 1985 году В.И. Пыцким и соавторами [4] был открыт феномен специфического угнетения аллергеном стимулированной сульфатом бария люминолзависимой хемилюминесценции (СЛХЛ) периферической крови сенсibilизированных людей. На основе этого феномена был разработан тест для выявления специфической сенсibilизации к пыльцевым, бытовым, лекарственным (пенициллин) и другим аллергенам [4]. Выявлено угнетение СЛХЛ у пациентов с atopическими заболеваниями в пробах крови со специфическим аллергеном при отсутствии изменений на неспецифические агенты. При этом было доказано, что инкубация крови со специфическим аллергеном не приводит к ингибированию НАДФН-

оксидазной активности полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ), а развитие указанного феномена, по-видимому, связано с угнетением активности миелопероксидазы (МПО) ПМЛ [5]. Позже нами было установлено изменение СЛХЛ крови при псевдоаллергии. Так, добавление НПВП, тартразина, выступающих в роли псевдоаллергенов, к пробам крови пациентов с их непереносимостью также вызывало угнетение СЛХЛ крови, которое оказалось дозозависимым [7, 6]. По результатам исследований был разработан безопасный и экономичный тест *in vitro* для диагностики непереносимости псевдоаллергенов (НПВП, тартразина) [7, 6]. Между тем до настоящего времени не известно, какой вклад в развитие феномена ингиби-

рования СЛХЛ крови под влиянием псевдоаллергенов у пациентов с их непереносимостью вносит НАДФН-оксидаза ПМЛ. Для получения ответа на данный вопрос было проведено настоящее исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были 75 больных (49 женщин и 26 мужчин) с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака в возрасте от 19 до 70 лет. Из этих больных у 51 непереносимость указанных НПВП проявлялась в виде поражения органов дыхания (аспириновая астма, ринит), у 24 – в виде крапивницы, отека Квинке. Группа пациентов с непереносимостью диклофенака включала 18 человек, с непереносимостью аспирина – 35 человек, с непереносимостью анальгина – 29 человек. У 9 пациентов непереносимость НПВП сочеталась с непереносимостью тартразина. Непереносимость тартразина подтверждалась данными анамнеза и проявлялась клинически в виде бронхоспазма/ринита (5 человек) или крапивницы/отека Квинке (4 человека). В крови всех обследованных пациентов IgE к исследуемым НПВП, тартразину не были выявлены.

Критерии включения пациентов в исследование: приступы экспираторного диспноэ, ринит, крапивница, отек Квинке при приеме НПВП (аспирина и/или анальгина и/или диклофенака) в любой лекарственной форме, а также продуктовых изделий, напитков, лекарственных препаратов, окрашенных тартразином, в ближайшие 2 недели до исследования.

Критерии исключения: прием антигистаминных, антисеротониновых, антилейкотриеновых препаратов, интала, НПВП, а также пищевых изделий, напитков, лекарственных форм, окрашенных тартразином, в ближайшие 2 недели до исследования.

Контрольная группа здоровых доноров, не контактировавших с НПВП, а также с пищевыми изделиями, напитками и лекарственными формами, содержащими тартразин, в ближайшие 2 недели до эксперимента, состояла из 45 человек (24 женщины и 21 мужчины) в том же возрастном диапазоне.

Для исследования использовали гепаринизированную венозную кровь объемом 4,5 мл (концентрация гепарина – 50 ЕД/мл). Клиническое исследование одобрено Межвузовским комитетом по этике, протокол № 05-12 от 17.05.2012 г. Непосредственно перед проведением исследования производили подсчет лейкоцитарной формулы крови с определением количества и жизнеспособности ПМЛ.

Из образцов крови отбирали объемы, содержащие 1×10^6 лейкоцитов, и доводили их до 0,69 мл средой Хенкса. Затем к полученным образцам добавляли 0,01 мл раствора салицилата натрия, метамизола натрия, диклофенака натрия или тартразина в различных концентрациях. Конечные концентрации салицилата натрия составляли от 0,06 мМ до 12 мМ; метамизола натрия – от 0,6 мкМ до 3000 мкМ; диклофенака натрия – от 0,6 мкМ до 300 мкМ, тартразина – от 0,4 мкМ до 2000 мкМ. Салицилат натрия (порошок, Екатеринбургская фарм. фабрика, Россия), метамизол натрия (порошок, Медокеми Лтд, Кипр), тартразин (порошок, Baker Flavors, Индия) растворяли в физиологическом растворе, диклофенак натрия (порошок, Фармстандарт, Россия) – в воде для инъекций. В контрольные пробы вместо используемых препаратов добавляли физиологический раствор или воду для инъекций в том же объеме. 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 биохемилуминесцентном анализаторе БЛМ 3606 - 01 (г. Красноярск), сигнал от которого поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы VLM-Obgrab. В качестве активатора свечения использовали люцигенин (отражает количество супероксидного анион радикала, продукт активности НАДФН-оксидазы ПМЛ) [1]. 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.

С помощью компьютерной программы VLM-Obgrab определяли площадь под кривой ХЛ, отражающую светосумму ХЛ. При оценке влияния псевдоаллергенов на ХЛ ПМЛ рассчитывали относительную светосумму свечения, как отношение светосумм свечения (площадей под кривыми ХЛ) опытной и контрольной проб.

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 от-

личия измеряемых величин определяли, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверно значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние псевдоаллергенов (салицилата, метамизола, диклофенака натрия и тартразина) на стимулированную сульфатом бария люцигенин-зависимую хемилюминесценцию (СЛЦХЛ) крови пациентов с их непереносимостью и здоровых доноров показано на рис. 1-4. Поскольку предва-

рительные исследования не выявили достоверных отличий в изменении СЛЦХЛ крови под влиянием салицилата натрия в группах пациентов с разными клиническими проявлениями непереносимости аспирина, мы объединили всех пациентов с различными клиническими проявлениями непереносимости аспирина в одну группу. Аналогичный результат мы получили также в предварительных исследованиях по изучению влияния метамизола, диклофенака натрия и тартразина на СЛЦХЛ крови пациентов с непереносимостью данных псевдоаллергенов с разными клиническими проявлениями.

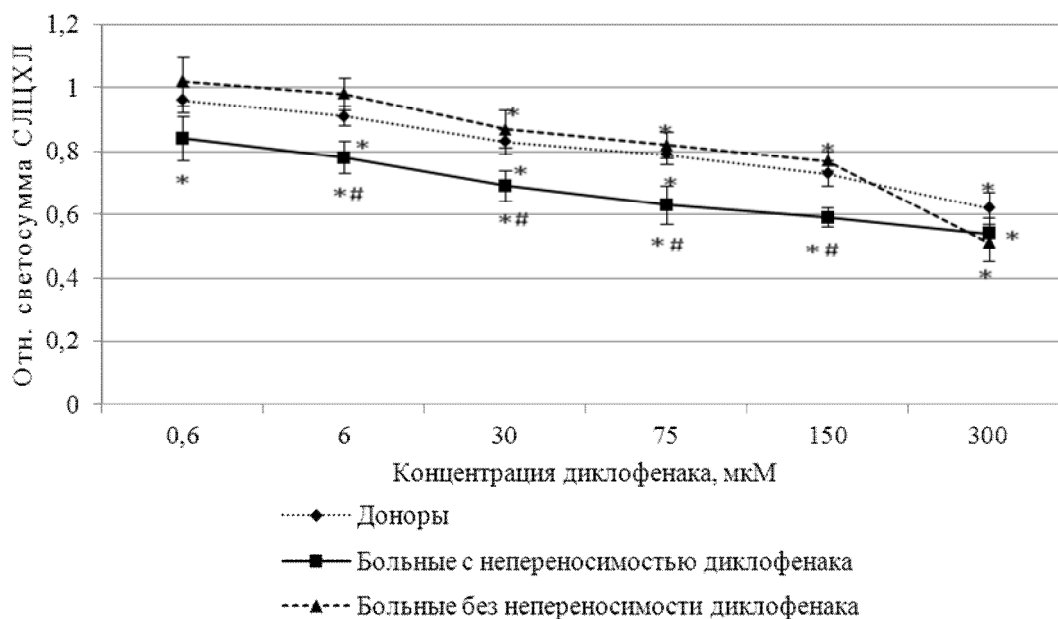


Рис. 1. Зависимость относительной светосуммы СЛЦХЛ крови от концентрации диклофенака натрия у здоровых доноров и пациентов с непереносимостью НПВП.

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля; # – $p < 0,05$ относительно аналогичной точки у здоровых доноров.

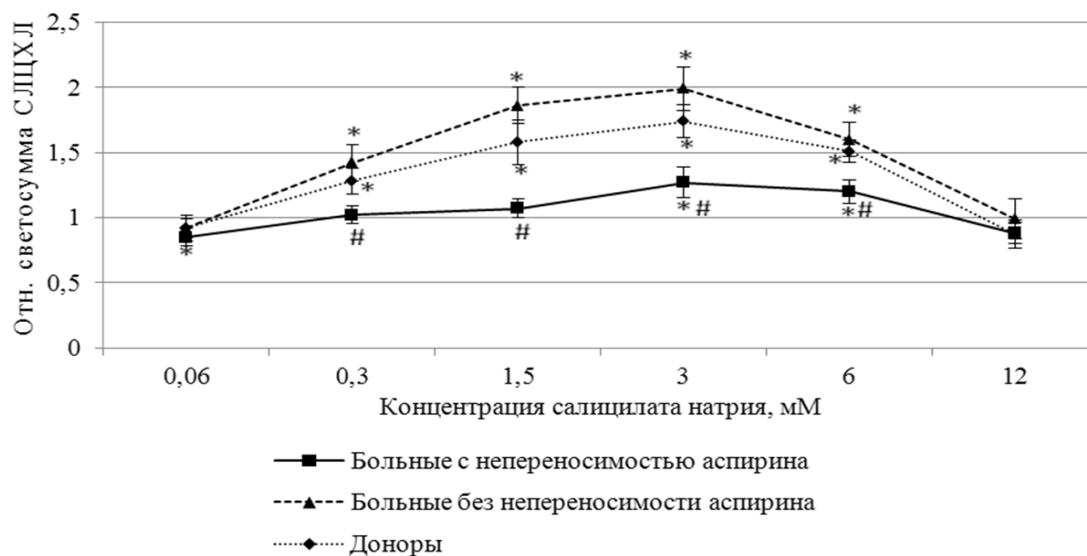


Рис. 2. Зависимость относительной светосуммы СЛЦХЛ крови от концентрации салицилата натрия у здоровых доноров и пациентов с непереносимостью НПВП.

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля; # – $p < 0,05$ относительно аналогичной точки у здоровых доноров.

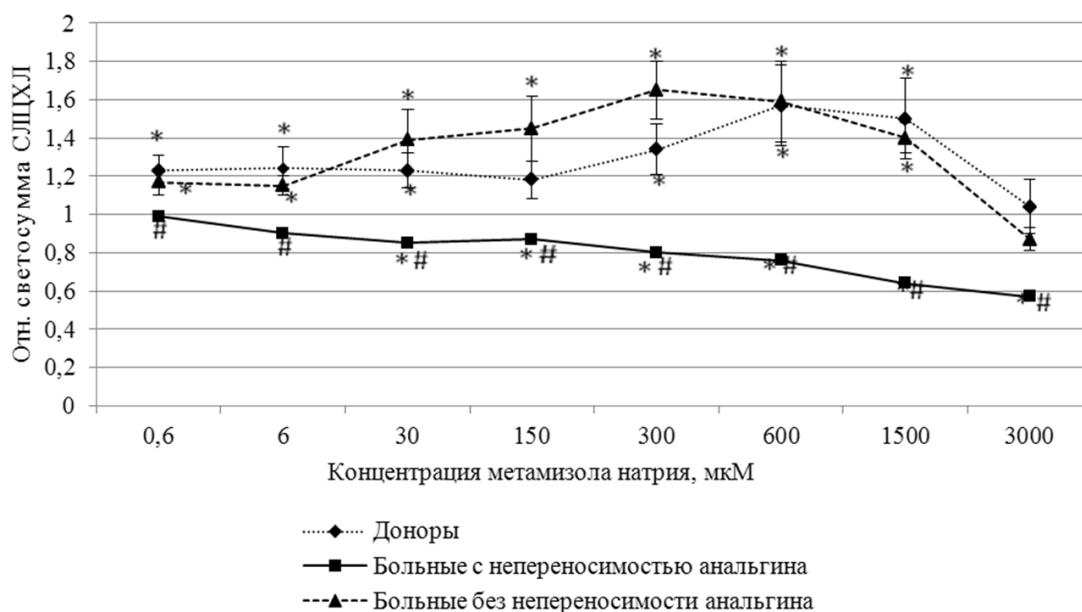


Рис. 3. Зависимость относительной светосуммы СЛЦХЛ крови от концентрации метамизола натрия у здоровых доноров и пациентов с непереносимостью НПВП.

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля; # – $p < 0,05$ относительно аналогичной точки у здоровых доноров.

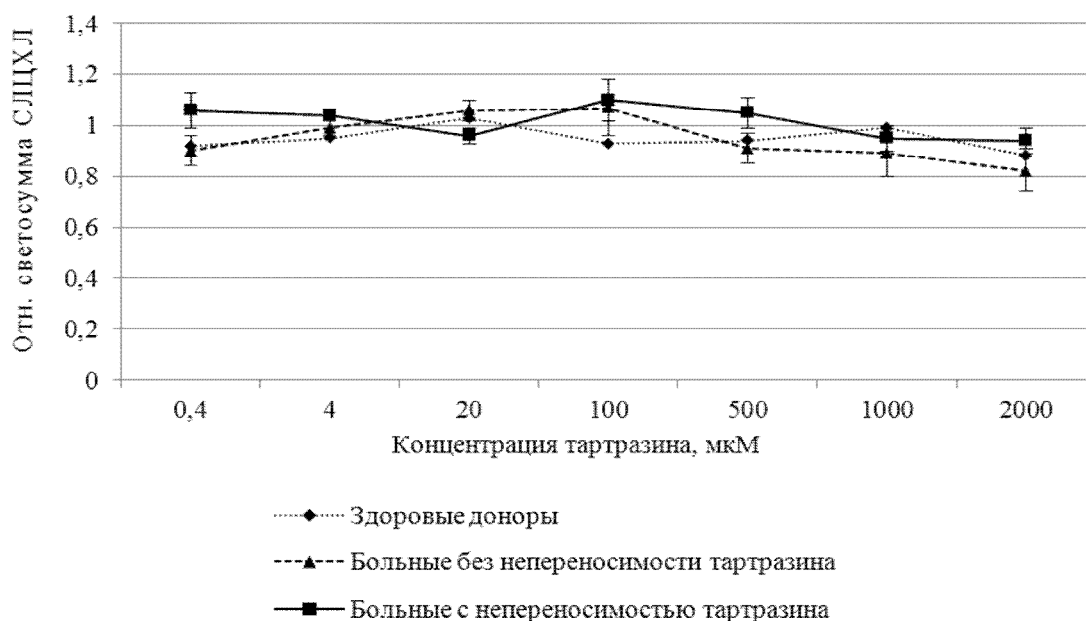


Рис. 4. Зависимость относительной светосуммы СЛЦХЛ крови от концентрации тартразина у здоровых доноров и пациентов с непереносимостью НПВП в сочетании и без такового с непереносимостью тартразина.

Как видно из рис. 1-3, НПВП оказывают модифицирующее влияние на СЛЦХЛ цельной крови здоровых доноров и пациентов с непереносимостью данных препаратов. У пациентов с непереносимостью НПВП показатели СЛЦХЛ крови под влиянием соответствующих препаратов достоверно ниже таковых здоровых доноров, что косвенно свидетельствует об угнетении активности НАДФН-оксидазы ПМЛ. У пациентов с непереносимостью НПВП при отсутствии повышенной чувствительности к какому-либо НПВП показатели СЛЦХЛ крови при воздействии этого

НПВП не имеют достоверных отличий от таковых здоровых доноров. Вместе с тем имеются различия в активности НАДФН-оксидазы ПМЛ крови при использовании НПВП с различной химической структурой (диклофенака натрия, салицилата натрия, метамизола натрия) у всех групп исследуемых лиц.

Прединкубация проб крови с тартразином (рис. 4) не сопровождается существенным изменением светосуммы СЛЦХЛ крови при всех концентрациях красителя как у доноров, так и у больных с непереносимостью НПВП в сочетании

или без такового с непереносимостью тартразина, что косвенно свидетельствует об отсутствии существенных изменений активности НАДФН-оксидазы ПМЛ крови у всех групп исследуемых лиц. Выраженное подавление СЛХЛ крови, развивающееся под воздействием тартразина, у больных с повышенной чувствительностью к данному красителю [6], по-видимому, в значительной степени связано с угнетением активности МПО ПМЛ. НАДФН-оксидаза ПМЛ не участвует в реализации феномена подавления СЛХЛ крови под влиянием тартразина у пациентов с его непереносимостью.

Мы склонны полагать, что различия в показателях СЛЦХЛ цельной крови больных с непереносимостью НПВП по сравнению с донорами при прединкубации проб крови с НПВП связаны с влиянием на ферменты окислительного метаболизма находящихся в плазме крови биологически активных веществ (медиаторов), содержание и соотношение которых различно у доноров и больных с непереносимостью НПВП. Наше предположение хорошо соотносится с результатами экспериментальных и клинических исследований, доказывающих, что на фоне стимуляции аспирином *in vitro* увеличивается высвобождение сульфидолейкотриенов лимфоцитами периферической крови у пациентов с непереносимостью аспирина, по сравнению с толерантными к указанному препарату лицами [10]. Более того, при непереносимости ацетилсалициловой кислоты аспирин провоцирует синтез и высвобождение лимфоцитами периферической крови 15-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты *in vitro*, стимулирует высвобождение гистамина из тромбоцитов, базофилов, тучных клеток [11]. Последнее подтверждается тем фактом, что у больных реакция на НПВП нередко сопровождается увеличением гистамина в плазме крови и его выведения с мочой [3]. По-видимому, биологически активные вещества, воздействуя на ПМЛ, способны изменять активность ферментов окислительного метаболизма ПМЛ, в том числе НАДФН-оксидазы, и, следовательно, модифицировать СЛЦХЛ крови. В частности, при изучении влияния гистамина, используемого в различных концентрациях, на окислительный метаболизм ПМЛ было выявлено, что гистамин дозозависимо изменяет активность НАДФН-оксидазной и миелопероксидазной ферментных систем ПМЛ [2]. Наше предположение о том, что именно биологически активные вещества плазмы изменяют активность ферментов окислительного метаболизма ПМЛ, в том числе НАДФН-оксидазы, подтверждается ранее полученными нами экспериментальными данными по изучению влияния НПВП на СЛХЛ и СЛЦХЛ выделенных ПМЛ больных с непереносимостью НПВП и здо-

ровых доноров. Было выявлено, что показатели СЛХЛ и СЛЦХЛ суспензии ПМЛ под влиянием НПВП не имеют достоверных отличий от аналогичных показателей здоровых доноров ($p > 0,01$) [9]. Аналогичный результат был получен в экспериментах по исследованию влияния тартразина на СЛХЛ и СЛЦХЛ выделенных ПМЛ пациентов с непереносимостью данного красителя и здоровых доноров [8].

Отсутствие различий между показателями СЛЦХЛ крови у пациентов с непереносимостью тартразина и здоровых доноров при наличии достоверных ($p < 0,05$) различий между показателями СЛХЛ крови [6], вероятно, связано с тем, что под влиянием тартразина у больных с его непереносимостью изменяется соотношение биологически активных веществ (медиаторов) плазмы таким образом, что преимущественно увеличивается содержание медиаторов, ингибирующих активность МПО ПМЛ и не оказывающих существенного влияния на активность НАДФН-оксидазы ПМЛ.

Таким образом, одним из механизмов ингибирования СЛХЛ крови под влиянием НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов является снижение активности НАДФН-оксидазы ПМЛ относительно таковой здоровых доноров. Вместе с тем, НАДФН-оксидаза ПМЛ не вносит вклад в реализацию ингибирования СЛХЛ крови под влиянием тартразина.

Таким образом, в результате проведенных исследований доказано, что НАДФН-оксидаза ПМЛ участвует в реализации феномена ингибирования СЛХЛ крови под влиянием НПВП у пациентов с непереносимостью данных препаратов и не участвует в реализации феномена ингибирования СЛХЛ крови под влиянием тартразина у пациентов с непереносимостью данного красителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
2. 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 // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2008. – № 1. – С. 93-96.
3. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В. Аллергические заболевания / под ред. В.И. Пыцкого – М. : Издательство «Триада-Х», 1999. – 470 с.
4. Пыцкий В.И., Сюсюкин Ю.П., Филатов О.Ю., Шерстнев М.П. Способ выявления сенсibilизации организма при аллергических заболеваниях //

- Авторское свидетельство № 1436643. Приоритет 13.12.85. Зарегистрир. 8.07.88.
5. *Пыцкий В.И., Филатов О.Ю.* К механизму специфического подавления стимулированной хемилюминесценции полиморфно-ядерных лейкоцитов при аллергических процессах // Бюлл. эксп. биол. – 1994. – Т. 117, № 1. – С. 299-301.
 6. *Чаусова С.В., Бондарева Г.П., Гуревич К.Г., Усанова Е.А., Арутюнова Е.Э., Малышев И.Ю.* Возможность применения метода стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции для диагностики непереносимости пищевого красителя тартразина // Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. – № 4. – С. 136-140.
 7. *Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Бондарева Г.П., Филатов О.Ю., Малышев И.Ю.* Возможность диагностики непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов по изменению хемилюминесцентного свечения полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2014. – № 4. – С. 121-132.
 8. *Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Бондарева Г.П., Арутюнова Е.Э., Малышев И.Ю.* Влияние пищевого красителя тартразина на хемилюминесценцию полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови у пациентов с непереносимостью тартразина // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2014. – № 2. – С. 73-78.
 9. *Чаусова С.В., Гуревич К.Г., Усанова Е.А., Арутюнова Е.Э., Балякин Ю.В., Малышев И.Ю.* Влияние нестероидных противовоспалительных препаратов на хемилюминесценцию полиморфно-ядерных лейкоцитов у пациентов с непереносимостью данных препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 5. – С. 28-31.
 10. *Kim M.S., Cho Y.J.* Flow Cytometry-Assisted Basophil Activation Test as a Safe Diagnostic Tool for Aspirin/NSAID Hypersensitivity // Allergy Asthma Immunol Res. – 2012. – Vol. 4, N 3. – P. 137-142.
 11. *Kowalski M.L., Makowska J.S.* Аспирин-зависимые заболевания органов дыхания. Современные подходы к диагностике и лечению // Allergy Clin. Immunol. Int.-J. World Allergy Org. Russ. Ed. – 2007. – Vol. 2, N 1. – P. 12-22.