

БИОЛОГИЯ

УДК 618.12

ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНАЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВАЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ГОРМОНОЗАВИСИМОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

© 2003 г. В.Г. Артюхов, И.Е. Лялина, О.В. Башарина, Н.А. Аксенова*,
Л.С. Свекло*, Н.М. Воробей*

Воронежский государственный университет

**МУЗ городская клиническая больница № 9 (скорой медицинской помощи)*

Установлено, что для больных бронхиальной астмой в период обострения характерна повышенная интенсивность процессов ПОЛ в мембранах лимфоцитов. В результате проведения курса экстракорпоральной УФ- и фармакологической модификации лимфоцитов у больных бронхиальной астмой средней степени тяжести происходит нормализация исходно завышенных значений СОД-активности, интенсивность процессов ПОЛ при этом снижается, оставаясь, однако, все еще выше нормы. Показано, что экстракорпоральная фотомодификация лимфоцитов существенно расширяет спектр возможностей эфферентного воздействия на кровь при бронхиальной астме, эффективно дополняя его немедикаментозное действие за счет оптимизации способа гормонотерапии.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время случаи глюкокортикостероидозависимой бронхиальной астмы стали нередким явлением. До 5 - 7 % больных атопической бронхиальной астмой нуждаются в длительном, а иногда и постоянном применении глюкокортикостероидов (ГКС) системного типа действия [1]. Сказанное вынуждает предпринимать поиски новых способов лечения больных бронхиальной астмой.

Национальная программа по борьбе с бронхиальной астмой и программа GINA (Global Initiative National Asthma) предполагают поиск методов лечения с учетом рационального использования медикаментов в сочетании с немедикаментозной терапией. В последние годы широко используются методы плазмафереза, ультрафиолетовой, магнитной и лазерной обработки крови, которые в значительной степени способствуют решению патогенетических проблем заболевания: элиминации из кровотока продуктов деградации, снижению титра антител, иммунокоррекции, купированию очагов воспаления, улучшению реологических свойств крови [2-4]. Введение гормонов при бронхиальной астме во взвесь отмытых лимфоцитов в клинике применяли И.С. Гущин и соавт. [5]. Эффекты фотомодификации клеток крови при различных заболеваниях описаны в работах многих авторов [4, 6]. Предлагаемый нами способ экстракорпоральной УФ- и фармакологической модификации

лимфоцитов (ЭФМЛ) предполагает создание алгоритма лечения бронхиальной астмы, основанного на сочетании этих методов, когда предварительная фотомодификация пула лимфоцитов становится основой для адаптивного переноса фармакологически модифицированных аутологических клеток.

По мнению ряда авторов [7, 8], в развитии многих патологических состояний организма ведущую роль играет свободнорадикальное пероксидное окисление липидов (ПОЛ), представляющее собой один из важнейших универсальных процессов повреждения мембранных систем, изменяющий химический состав, физические параметры и функциональные характеристики биомембран. Известно, что в качестве инициаторов ПОЛ выступают активные формы кислорода, в частности супероксидный анион-радикал, в дезактивации которого ведущая роль принадлежит супероксиддисмутазе (СОД) - одному из основных ферментов антиоксидантной защиты организма.

В связи с этим мы изучили динамику СОД-активности и интенсивности процессов ПОЛ в лимфоцитах больных бронхиальной астмой на разных этапах проведения ЭФМЛ.

МЕТОДИКА

За время проведения исследований была обследована кровь 34 человек: 14 доноров и 20 больных бронхиальной астмой смешанного типа:

15 женщин и 5 мужчин в возрасте от 40 до 56 лет (средний возраст $46,9 \pm 1,3$ года), продолжительность заболевания - от 2 до 16 лет.

В комплекс базисной терапии включали курс лечебного дискретного плазмодифереза из 3-4 сеансов, проводимых через день. Аутологичную лейкоцитарную массу в количестве 120 ± 5 мл, обогащенную лимфоцитами до концентрации $(4-8) \cdot 10^9$ клеток/л, облучали УФ-светом с длиной волны 254 нм в течение 15-20 мин в кювете с барбитацией для перемешивания стерильным потоком кислорода. В подготовленную таким образом взвесь добавлялась полусуточная доза глюкокортикостероидного гормона (дексаметазон, преднизолон), получаемого пациентом на данном этапе лечения. После инкубации в термостате при 37°C в течение 60 мин лейкоцитарная масса реинфузировалась больному. Параллельно элиминировалось 17-20 % от объема циркулирующей плазмы (ОЦП), что за курс составило 51-80 % ОЦП. Восполнение объема циркулирующей крови проводилось кристаллоидными растворами из расчета 1:1,2 - 1:1,5 от удаленного объема плазмы. Реакций и осложнений отмечено не было. Для проведения экстракорпорального воздействия на кровь использовали: рефрижераторные центрифуги РС - 6, ЦЛП - 3-3,5; аппарат для УФ-облучения крови "Надежда" с лампой ДРБ - 8; "Темаконы 500/300", системы магистралей.

Клинико-лабораторное наблюдение проводилось на всех этапах лечения. Исследовали показатели периферической крови, биохимический статус, гемостазиологию и состояние микроциркуляторного русла. С целью детального изучения молекулярных механизмов предложенного метода гемотерапии проводились исследования динамики СОД-активности и интенсивности процессов ПОЛ лимфоцитов пациентов. Лимфоциты доноров и больных выделяли из лейкоцитарной массы в присутствии гепарина (50 Ед/мл) центрифугированием при 1500 об/мин (15 мин, 20°C) на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл). Об интенсивности ПОЛ в лимфоцитах судили по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [9]. Измерение ХЛ проводили при 37°C с использованием биохемилюминметра БХЛ-06 М. С этой целью кювету, содержащую лимфоциты ($(2-4) \cdot 10^5$ клеток/мл), помещали в измерительную камеру люминметра, затем в суспензию вводили люминол в конечной концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и в течение 600 с проводили запись спонтанной ХЛ.

СОД-активность лимфоцитов определяли хемилюминесцентным методом, в основу которого положена способность супероксиддисмутазы ингибировать вспышку ХЛ, сопровождающую реакцию генерации O_2 системой рибофлавин-тетраметилэтилендиамин. Среда инкубации содержала компоненты согласно прописи [10].

СОД-активность (А) оценивали в относительных единицах по формуле:

$$A = (I_k - I_0) / I_k, \text{ отн.ед.},$$

где I_k - интенсивность ХЛ в контрольной кювете; I_0 - интенсивность ХЛ в опытной кювете, содержащей $0,1$ мл супернатанта, полученного путем гипоосмотического гемолиза лимфоцитов (1:1 с дистиллированной водой, инкубация в течение 20 мин при 4°C) с последующим центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин).

Результаты опытов обрабатывали с помощью пакета прикладных статистических программ "Statgraphics". Достоверность различий сравниваемых показателей оценивали методом парных сравнений, используя t критерий Стьюдента при уровне значимости 95% .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении интенсивности ХЛ и СОД-активности лимфоцитов доноров было установлено, что в норме интенсивность ХЛ равна $0,41 \pm 0,06$ мВ, СОД-активность составила $0,38 \pm 0,02$ отн.ед.

В дальнейшем нами исследовалась динамика данных показателей у больных бронхиальной астмой в ходе проведения ЭФМЛ. Исследуемые параметры регистрировались до и после УФ-облучения лейкоцитарной массы, а также после инкубации УФ-модифицированных лейкоцитов с ГКС.

На основании исходного уровня СОД-активности и интенсивности ПОЛ лимфоцитов все больные были разделены на 2 группы. В первую группу вошли 16 пациентов, СОД-активность лимфоцитов крови которых была выше нормы приблизительно в 1,3 раза и составляла $0,49 \pm 0,02$ отн.ед., а интенсивность ХЛ - $1,24 \pm 0,08$ мВ, что в 3 раза превышает ее нормальное значение. Вторую группу составили 4 больных, интенсивность ХЛ лимфоцитов которых была в 6,8 раза выше нормы и составляла $2,75 \pm 0,42$ мВ, а активность СОД ниже нормальных значений приблизительно в 1,4 раза - $0,27 \pm 0,02$ отн.ед. Эта группа больных характеризовалась более тяжелым и длительным течением заболевания.

У всех обследованных больных отмечено острое протекание воспалительного процесса, что находит отражение в повышении интенсивности процессов ПОЛ в мембранах лимфоцитарных клеток. Подобное изменение интенсивности данного показателя выявлено многими авторами при наличии в организме воспалительной реакции [11,12], причем степень увеличения ХЛ пропорциональна тяжести заболевания [13]. В работе [14] показано, что бронхиальная астма сопровождается понижением активности внутриклеточной СОД; сходные изменения зарегистрированы нами у 2 группы больных. В наших исследованиях также обнаружена статистически достовер-

но повышенная активность СОД у больных 1 группы относительно таковой у здоровых доноров. Этот эффект можно объяснить как адаптивную реакцию антиоксидантной системы на повышение уровня ПОЛ. Известно, что при повышении концентрации специфического субстрата активность большинства ферментов вначале возрастает, а затем, в результате накопления продукта реакции, снижается. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что показатели СОД-активности у 1 группы больных бронхиальной астмой находятся в первой фазе изменений: компенсаторного усиления антирадикальной защиты, а у 2 группы больных – во второй фазе: истощения ее, ведущего к углубляющимся нарушениям функции мембран и внутриклеточных систем регулирования метаболизма [15].

Воздействие УФ-радиации стимулирует протекание свободнорадикальных процессов в организме, активацию процессов ПОЛ [4]. В проведенных нами исследованиях также показано повышение интенсивности процессов ПОЛ после облучения лимфоцитарных клеток УФ-светом, которое носит достоверный характер на 1 и 3 сеансах ЭФМЛ и составляет 16 и 45 % у 1 группы пациентов (рис. 1а), а также 12 и 20 % соответственно у 2 группы больных (рис. 2а).

На первом сеансе у 1 группы пациентов происходит уменьшение СОД-активности лимфоцитов после

воздействия УФ-света на 16 % (рис. 1б). Данный эффект может быть обусловлен происходящей при воздействии УФ-света фотоинактивацией каталазы [16] и, как следствие, накоплением пероксида водорода, являющегося ингибитором активности СОД. В то же время Т. И. Гудзь и соавт. [17] установили, что гидропероксиды ненасыщенных жирных кислот – основные продукты начальных стадий ПОЛ – также способны ингибировать активность СОД. Нами зарегистрировано повышение СОД-активности на третьем этапе проведения данной группе больных бронхиальной астмой ЭФМЛ-терапии на 14 %. Ранее было установлено [18], что воздействие УФ-излучения на растворы СОД приводит к повышению активности фермента в диапазоне доз 450-2260 Дж/м². Вероятно, в процесс фотоактивации фермента вносят вклад структурные перестройки, связанные с разворачиванием белковой глобулы. При изучении активности СОД в эритроцитах больных сепсисом было показано [18], что проведение сеанса АУФОК-терапии приводит к возрастанию активности молекул этого фермента.

К началу второго и третьего сеансов ЭФМЛ у 1 группы больных происходит уменьшение изучаемых параметров: СОД-активность понизилась на 29 и 41 %, а интенсивность ПОЛ – на 17 и 20 % соответственно относительно исходного уровня (до начала проведения ЭФМЛ). Подобный эффект, воз-

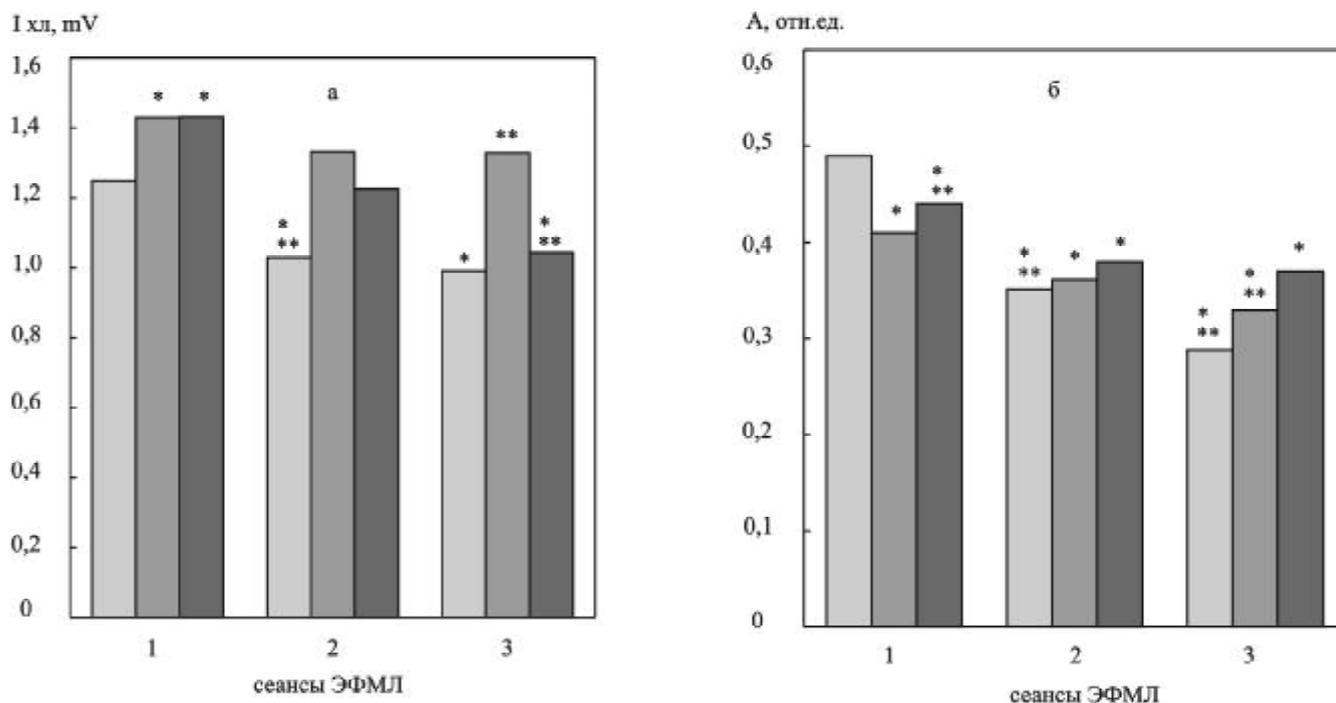


Рис. 1. Динамика интенсивности хемилюминесценции (а) и СОД-активности (б) лимфоцитов 1 группы больных бронхиальной астмой на разных этапах проведения ЭФМЛ.

Обозначения:

□ до УФО; ■ после УФО; ■ +ГКС.

Примечания: * – отличия достоверны по сравнению с исходным уровнем;

** – отличия достоверны по сравнению с предыдущим значением, уровень значимости 95 %.

можно, обусловлен адаптацией организма в ответ на комплексное воздействие УФ-света и ГКС на лимфоцитарные клетки. Известно, что ГКС, наряду с серотонином, гистамином и другими биогенными аминами, обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью [19], следствием чего, возможно, и является регистрируемое нами понижение процессов ПОЛ в лимфоцитах больных бронхиальной астмой в ходе лечения. В то же время, уменьшению интенсивности процессов ПОЛ у 1 группы пациентов способствует повышение СОД-активности при инкубации лейкомаксы с ГКС. У 2 группы больных отмечается повышение СОД-активности к началу второго и третьего сеансов ЭФМЛ-терапии на 12 и 33 % соответственно (рис. 2б).

Таким образом, по окончании данного курса терапии у больных 1 группы активность СОД составляла $0,37 \pm 0,03$ отн.ед., что соответствует нормальным значениям, а интенсивность ХЛ лимфоцитов понизилась на 15 % и оказалась равной $1,05 \pm 0,08$ мВ, что все еще в 2,6 раза выше нормы.

Происходящее на протяжении всего курса ЭФМЛ снижение изучаемых параметров и стремление их в своей динамике к норме у 1 группы больных может являться следствием частичного купирования воспалительного процесса, отмечаемого многими

авторами при проведении УФ-облучения крови [20, 21]. При уменьшении интенсивности воспалительного процесса снижается количество образующихся в очаге воспаления активных форм кислорода, в частности, супероксидного анион-радикала, следствием этого является наблюдаемое нами уменьшение СОД-активности и интенсивности ПОЛ лимфоцитов больных бронхиальной астмой. Динамика исследуемых показателей характеризуется положительной средней силы степенью корреляции (коэффициент корреляции=0,51).

В то же время у 2 группы пациентов значения СОД-активности по окончании лечения остались на прежнем уровне, интенсивность ПОЛ понизилась на 42 % и приблизительно в 4 раза превышает нормальные значения.

Итак, в ходе проведения ЭФМЛ 2 группе больных бронхиальной астмой не происходит значительного изменения СОД-активности в ответ на повышенную генерацию в организме активных форм кислорода и, как следствие, очень высокую интенсивность процессов ПОЛ. Наблюдаемый эффект, возможно, обусловлен истощением антиоксидантной системы защиты организма в результате тяжелого течения заболевания. Вероятно, для достижения положительного клинического эффекта требуется про-

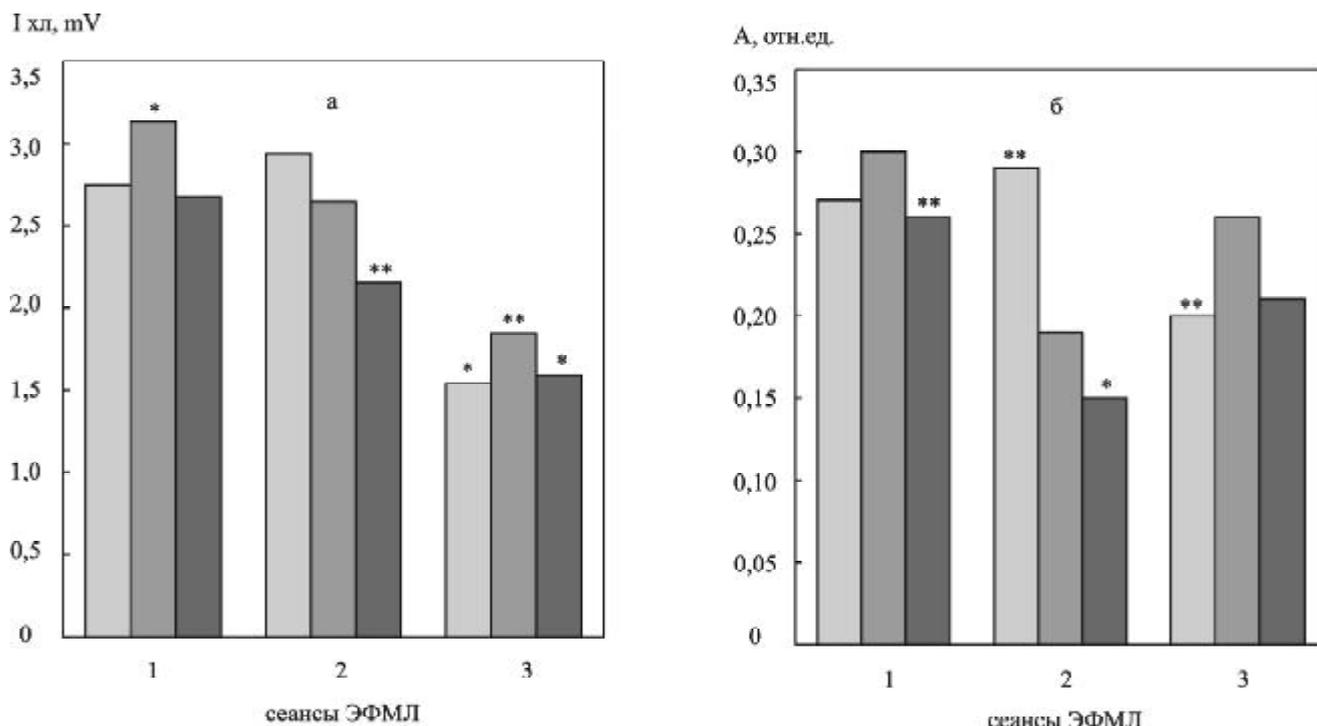


Рис. 2. Динамика интенсивности хемилюминесценции (а) и СОД-активности (б) лимфоцитов 2 группы больных бронхиальной астмой на разных этапах проведения ЭФМЛ.

Обозначения:

□ до УФО; ■ после УФО; ■ +ГКС.

Примечания: * – отличия достоверны по сравнению с исходным уровнем;

** – отличия достоверны по сравнению с предыдущим значением, уровень значимости 95 %.

ведение более интенсивной глюкокортикостероидной терапии, а также повышение реактивности антиоксидантной системы защиты организма от токсического и мембранеструктурирующего действия активных кислородных метаболитов.

При проведении ЭФМЛ больным бронхиальной астмой нами была предпринята попытка сокращения дозы ГКС гормона. Так, на первом и втором этапах процедуры в лейкозвесь больного добавлялась полусуточная доза, а на третьем этапе - четверть суточной дозы ГКС препарата, получаемого пациентом. В данном случае существовала опасность проявления синдрома "отмены" ГКС [22]. Однако применяемая схема лечения сопровождалась положительным клиническим эффектом и сделала осуществимым снижение дозы системных ГКС у больных бронхиальной астмой.

При стационарном наблюдении за состоянием пациентов было отмечено, что у 80 % больных по окончании курса полностью удалось купировать приступы удушья. У 20 % больных приступы удушья сократились с 4-5 до 1-2 раз в сутки (ночью). У 15 % на фоне проведенных процедур стала возможной полная отмена глюкокортикостероидов системного действия.

Продолжительность стационарного лечения снизилась и показатель койко/дня сокращен на $19 \pm 0,5$ %. Состояние периферической крови, величины биохимических показателей (аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, билирубин, амилаза, креатинин, общий белок) достоверно не менялись в ходе лечения, оставаясь в пределах нормальных значений.

Таким образом, проведение трех сеансов ЭФМЛ с ГКС у 1 группы больных бронхиальной астмой приводит к нормализации функциональной активности фермента антиоксидантной защиты организма - СОД, который является ключевым в регуляции скорости всего цикла превращения супероксидного аниона в другие активные формы кислорода и контролирующей тем самым скорость ПОЛ. В то же время, несмотря на нормализацию СОД-активности, интенсивность процессов ПОЛ к окончанию лечения остается все еще выше нормы, что создает предпосылки для возможного рецидива болезни.

Отмечаемая нами интенсификация процессов ПОЛ после УФ-облучения приводит к возрастанию метаболизма арахидоновой кислоты, к увеличению содержания лейкотриенов, тромбоксанов, что, в свою очередь, вызывает повышение проницаемости мембраны [23] и тем самым способствует усилению проникновения ГКС внутрь клетки. За счет облегчения диффузии через мембрану становится возможным достижение клинического эффекта меньшими дозами гормона. Однако изменение проводимости мембраны носит обратимый характер: ГКС стимулируют синтез липокортина-1, иммунорегуляторного бел-

ка, который угнетает образование метаболитов арахидоновой кислоты и фактора активации тромбоцитов путем подавления активности фосфолипазы A_2 и индуцибельной циклооксигеназы [24].

Установлено, что бронхиальная астма сопровождается понижением содержания в крови α -токоферола [25], а также активности каталазы [23], являющейся синергистом СОД. Возможно, проводимое лечение не приводит к нормализации этих показателей, что находит отражение в повышенной к окончанию ЭФМЛ-терапии интенсивности процессов ПОЛ в мембранах лимфоцитов.

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что ЭФМЛ является целесообразным методом лечения больных бронхиальной астмой средней степени тяжести. Интенсивность процессов ПОЛ и СОД-активность лимфоцитов, являясь показателями антиоксидантного статуса и состояния иммунной системы, отражают состояние организма в целом и могут быть использованы для диагностики и контроля за ходом лечения пациента. Показано, что экстракорпоральная фотомодификация лимфоцитов существенно расширяет спектр возможностей эфферентного воздействия на кровь при бронхиальной астме, эффективно дополняя его немедикаментозное действие за счет оптимизации способа гормонотерапии. Данный способ фотогемотерапии также экономически выгоден за счет сокращения длительности пребывания больного в стационаре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курбачева О.М., Порошина Ю.А., Гуцин И.С., Лесков В.П., Читаева В.Г., Прозоровский Н.С. // Пульмонология. 1992. № 2. С. 52-57.
2. Илларионов В. // Врач. 1993. № 8. С. 11-18.
3. Ишина Т.И., Кахновский И.М., Макарова О.В., Соломатин А.С., Алексеева М.Е. // Терапев. архив. 2001. Т. 73. № 3. С. 15-19.
4. Карандашов В.И., Петухов Е.Б. Ультрафиолетовое облучение крови. М. Медицина. 1997. 224 с.
5. Гуцин И.С., Порошина Ю.А., Феденко Е.С., Курбачева О.М., Прозоровский Н.С., Читаева В.Г., Лесков В.П., Полсачева О.В., Подобин Н.П. Способ лечения глюкокортикостероидзависимых атопических заболеваний // А. с. СССР №1311738, кл. А 61 К 45/05, 1988.
6. Жибурт Е.Б., Серебряная М.Б., Данильченко В.В., Блинова Е.Л., Рождественская Е.Н., Каткова И.В., Ващенко В.И., Бойцова М.Ю. // Эфферентная терапия. 1995. Т. 1. № 3. С. 56-58.
7. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж. Изд-во ВГУ. 2000. 296 с.
8. Пасечник И.Н. // Вестник интенсивной терапии. 2001. № 4. С. 3-9.

9. *Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П.* // Итоги науки и техники. 1989. Т. 24. 176 с.
10. *Рязанцева Л.Т., Баширина О.В., Артюхов В.Г.* // Тез. Докл. III съезда фотобиологов России. Воронеж. Изд-во ВГУ. 2001. С. 183-184.
11. *Даниляк И.Г., Коган А.Х., Болевич С.* // Терапев. архив. 1992. № 3. С. 54-57.
12. *Bryant R.W., Simon T.C., Bailey J.M.* // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 33-43.
13. *Бондарев И.Ш., Журавлев А.И., Шполянская А.М.* // Проблемы туберкулеза. 1971. Т. 9, № 7. С. 1-4.
14. *Алматуни В.Г., Карагезян К.В., Сафарян М.Д.* // Терапев. архив. 1980. № 3. С. 96-100.
15. *Абдусаламов А.В., Шафер А.М.* // Пульмонология. 1995. № 3. С. 54-57.
16. *Артюхов В.Г.* Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения. Воронеж. Изд-во ВГУ. 1995. 280 с.
17. *Гудзь Т.И., Пешикова Е.Г., Гончаренко Е.Н.* // Радиобиология. 1982. Т. 22. № 5. С. 674-677.
18. *Артюхов В.Г., Баширина О.В., Ваианов Г.А., Наквасина М.А., Путинцева О.В.* Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов. Воронеж. Изд-во ВГУ. 1997. 264 с.
19. *Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М.* Перекисное окисление и радиация. Киев. Наук. думка. 1991. 256 с.
20. *Палеев Н.Р., Ветчинникова О.Н., Плаксина Г.В., Бручьева И.С.* // Вестник РАМН. 1993. №. 3. С. 3-6.
21. *Пиксин И.Н., Атясов Н.И., Киселева Р.Е. и др.* // Хирургия. 1990. № 11. С. 100-103.
22. *Дранник Г.Н., Гриневич Ю.А., Дизик Г.М.* Иммунотропные препараты. Киев. Здоровье. 1994. 288 с.
23. *Юлдашева И.А.* // Иммунология. 2002. № 2. С. 107-109.
24. *Руководство по иммунофармакологии /под ред. М.М. Дейла, Дж.К. Формена/. М. Медицина. 1998. 332 с.*
25. *Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И.* Человек и противокислительные вещества. Л. Наука. Ленингр. отд-ние. 1985. 230 с.