

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ ДАННЫХ ПРЕПАРАТОВ

С. В. Чаусова¹, К. Г. Гуревич², Е. А. Усанова¹, Е. Э. Арутюнова¹,
Ю. В. Балякин¹, И. Ю. Малышев²

Исследовали интенсивность стимулированной сульфатом бария люминол- и люциген-инзависимой хемилюминесценции (СЛХЛ и СЛЦХЛ) выделенных из периферической крови полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЛ) после предварительной инкубации суспензии ПМЛ с салицилатом натрия, метамизолом натрия и диклофенаком натрия в разных концентрациях у доноров и больных с непереносимостью аспирина и/или метамизола натрия и/или диклофенака натрия. Достоверных различий показателей СЛХЛ и СЛЦХЛ выделенных ПМЛ у доноров и больных с непереносимостью данных препаратов не было выявлено, что косвенно свидетельствует об отсутствии каких-либо особенностей в работе ферментов окислительного метаболизма ПМЛ под воздействием используемых нестероидных противовоспалительных препаратов у больных с непереносимостью данных препаратов по сравнению с донорами.

Ключевые слова: хемилюминесценция; полиморфно-ядерные лейкоциты; нестероидные противовоспалительные препараты; непереносимость нестероидных противовоспалительных препаратов.

ВВЕДЕНИЕ

В 1985 г. В. И. Пыщким и соавт. [3] 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. Выявлено угнетение СЛХЛ у пациентов с atopическими заболеваниями в пробах крови со специфическим аллергеном при отсутствии изменений на неспецифические агенты. Также было установлено изменение СЛХЛ крови и при псевдоаллергии. Так, например, добавление салицилата натрия или анальгина к пробам крови пациентов с непереносимостью этих препаратов также вызывало угнетение СЛХЛ, которое оказалось дозозависимым [5]. По результатам исследований был разработан безопасный и экономичный тест *in vitro* для диагностики непереносимости аспирина и анальгина [9]. Доказано, что подавление СЛХЛ цельной крови связано с изменением активности НАДФН-оксидазы полиморф-

но-ядерных лейкоцитов (ПМЛ) при воздействии на кровь больных салицилата натрия и анальгина [6], причем это угнетение связано с участием гистаминового механизма [10]. Между тем, до настоящего времени не известно, связаны ли выявленные различия СЛХЛ крови под воздействием нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) у доноров и больных с непереносимостью НПВП исключительно с влиянием на ПМЛ крови биологически активных веществ (медиаторов, цитокинов) плазмы, или все же существуют какие-то особенности окислительного метаболизма ПМЛ у данной группы больных, проявляющиеся при воздействии на ПМЛ НПВП. Для получения ответа на данный вопрос было проведено настоящее исследование.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были 35 больных (24 женщины и 11 мужчин) с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака в возрасте от 19 до 70 лет. Из этих больных у 21 непереносимость указанных НПВП проявлялась в виде поражения органов дыхания (аспириновая астма, ринит), у 14 — в виде крапивницы, отека Квинке. Показания к включению пациентов в исследование: приступы экспираторного диспноэ, крапивница, отек Квинке на прием аспирина и/или анальгина и/или диклофенака в любой лекарственной форме (инъекции, таблетки, драже). Противопоказания к включению пациентов в исследование: проявления острой или обострение хронической инфекции, прием антигистаминных препаратов, системных глюкокортикостероидов, антибиотиков, других НПВП за 2 недели и менее до исследования. Контрольная группа практически здоровых людей

¹ Кафедра общей патологии медико-биологического факультета (зав. — проф. Ю. В. Балякин) ГБОУ ВПО “Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова” МЗ РФ, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1.

² Кафедра патологической физиологии лечебного факультета (зав. кафедрой — проф. И. Ю. Малышев) ГБОУ ВПО “Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова” МЗ РФ, Россия, 103473, Москва, ул. Делегатская, 20/1.

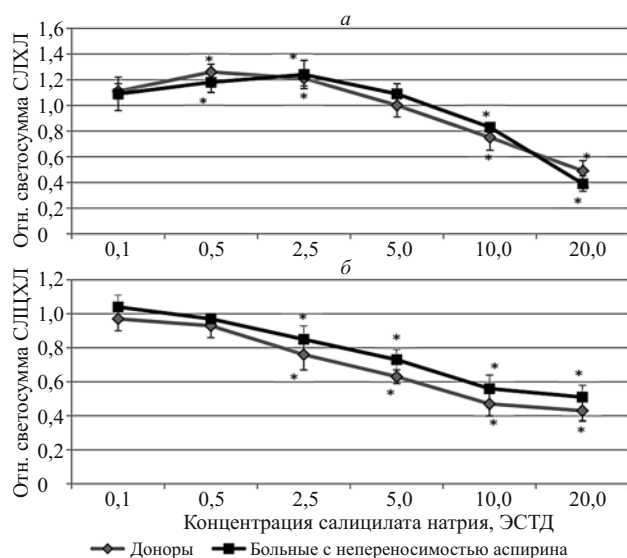


Рис. 1. Влияние салицилата натрия на относительную светосумму стимулированной люминолзависимой (а) и люцигенинзависимой (б) хемиллюминесценции суспензии полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови доноров и больных с непереносимостью аспирина.

ЭСТД — эквивалент средней терапевтической дозы, * — $p < 0,05$ относительно контроля.

состояла из 32 человек (22 женщины и 10 мужчин) в том же возрастном диапазоне, не принимавших НПВП в ближайшие 2 недели до эксперимента. Для исследования использовали суспензию ПМЛ, выделенных из гепаринизированной венозной крови объемом 4,5 мл (концентрация гепарина — 50 ЕД/мл). Выделение ПМЛ из периферической крови производили на градиенте двойной плотности фиколл — уротраст (1,093:1,077). Клиническое исследование одобрено Межвузовским Комитетом по этике, протокол № 05 – 12 от 17.05.2012 г. Непосредственно перед проведением исследования производили подсчет лейкоцитарной формулы суспензии ПМЛ с определением количества и жизнеспособности ПМЛ. Из образцов суспензии ПМЛ 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 или диклофенака натрия в различных концентрациях. Используемые концентрации препаратов выражали в эквивалентах средних терапевтических доз (ЭСТД). Конечные концентрации салицилата натрия составляли от 0,1 до 20 ЭСТД; метамизола натрия — от 0,002 до 2 ЭСТД; диклофенака натрия — от 0,02 до 10 ЭСТД. Салицилат натрия (порошок, Екатеринбургская фарм. фабрика, Россия) и метамизол натрия (порошок, Медокеми Лтд, Кипр) 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 °С при постоянном перемешивании. Жизнеспособность ПМЛ, определяемая окрашиванием трипановым синим, за время инкубации существенно не из-

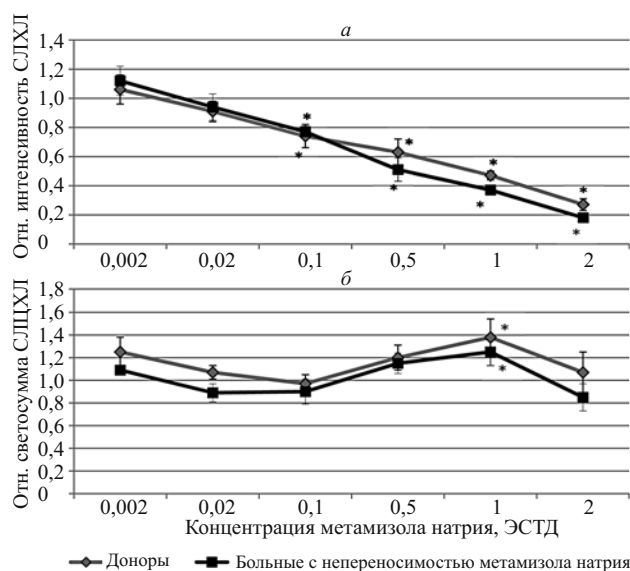


Рис. 2. Влияние метамизола натрия на относительную светосумму стимулированной люминолзависимой (а) и люцигенинзависимой (б) хемиллюминесценции суспензии полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови доноров и больных с непереносимостью метамизола натрия.

ЭСТД — эквивалент средней терапевтической дозы, * — $p < 0,05$ относительно контроля.

менялась. После инкубации проводили измерение интенсивности хемиллюминесценции (ХЛ) проб на 36-кюветном биохемиллюминесцентном анализаторе БЛМ 3606-01 (г. Красноярск), сигнал от которого поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы VLM-Obrab. В качестве активатора свечения использовали люминол (регистрирует суммарную секрецию активных форм кислорода, преимущественно гипохлорита; за образование последнего отвечает миелопероксидаза ПМЛ) и люцигенин (отражает количество $O_2^{\cdot -}$, продукт активности НАДФН-оксидазы ПМЛ) [1]. В кювету хемиллюминесцентного анализатора 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 СЛХЛ и стимулированной люцигенинзависимой ХЛ (СЛЦХЛ). Измерение ХЛ крови проводили в режиме постоянного перемешивания при температуре 37 °С.

С помощью компьютерной программы VLM-Obrab определяли площадь под кривой ХЛ, отражающую светосумму ХЛ. При оценке влияния НПВП на ХЛ ПМЛ рассчитывали относительную светосумму свечения, как отношение светосумм свечения 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 распределение нормальному устанавливали с помощью λ -критерия Колмогорова-Смир-

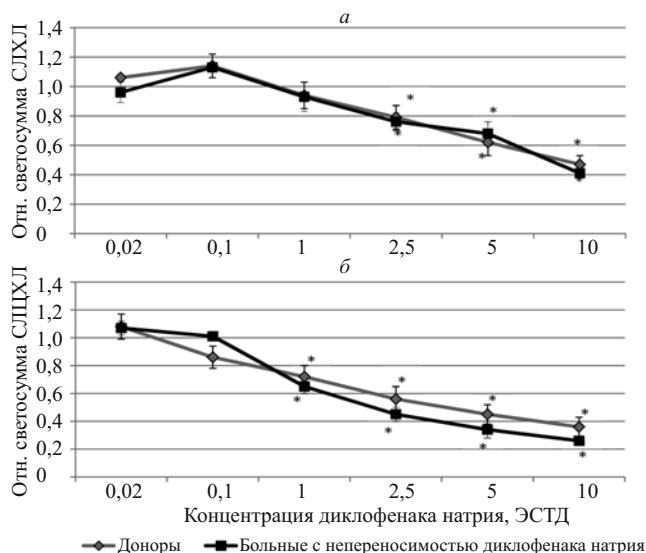


Рис. 3. Влияние диклофенака натрия на относительную светосумму стимулированной люминолзависимой (а) и люцигенинзависимой (б) гемилуминесценции суспензии полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови доноров и больных с непереносимостью диклофенака.

ЭСТД — эквивалент средней терапевтической дозы, * — $p < 0,05$ относительно контроля.

нова. 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 исследовали влияние салицилата натрия, метамизола натрия и диклофенака натрия на СЛХЛ выделенных ПМЛ у доноров и пациентов с непереносимостью аспирина и/или метамизола натрия и/или диклофенака натрия. Поскольку предварительные исследования не выявили достоверных отличий в изменении СЛХЛ выделенных ПМЛ 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 и диклофенака натрия на СЛХЛ выделенных ПМЛ пациентов с непереносимостью метамизола натрия и/или диклофенака натрия с разными клиническими проявлениями.

Результаты представлены на рис. 1, а, 2, а, 3, а.

Как видно из рис. 1, а, 2, а, 3, а, показатели относительной светосуммы СЛХЛ суспензии ПМЛ больных с непереносимостью аспирина и /или метамизола натрия и/или диклофенака натрия не имеют достоверных отличий от аналогичных показателей доноров ($p > 0,1$). Различия выявляются только при сравнении между собой указанных препаратов по их воздействию на окислительный метаболизм ПМЛ. Так, метамизол натрия и диклофенак натрия оказывают сходное влияние на СЛХЛ ПМЛ. Малые концентрации метамизола натрия (0,002

ЭСТД, 0,02 ЭСТД) и диклофенака натрия (0,02 ЭСТД, 0,2 ЭСТД, 1 ЭСТД) не вызывают существенных изменений СЛХЛ ПМЛ ($p > 0,1$). При увеличении концентрации указанных препаратов развивается дозозависимое угнетение СЛХЛ, наиболее выраженное при воздействии на ПМЛ метамизола натрия, поскольку подавление СЛХЛ ПМЛ под влиянием последнего наблюдается уже при концентрации 0,1 ЭСТД, в то время как диклофенак натрия оказывает угнетающее действие на СЛХЛ ПМЛ при концентрациях, превышающих 1 ЭСТД. Ингибирование СЛХЛ ПМЛ под влиянием салицилата натрия наблюдается только при высоких концентрациях препарата (10 ЭСТД, 20 ЭСТД), при концентрациях в диапазоне 0,5 ЭСТД – 2,5 ЭСТД, напротив, отмечается незначительная стимуляция СЛХЛ ПМЛ (примерно на 20 %).

Таким образом, суммарная секреция активных форм кислорода выделенными ПМЛ под воздействием салицилата натрия, метамизола натрия и диклофенака натрия у доноров не имеет достоверных отличий от таковой у больных с непереносимостью аспирина и/или анальгина и/или диклофенака. Выявляются различия в суммарной выработке активных форм кислорода ПМЛ при сравнении между собой влияния исследуемых НПВП на СЛХЛ ПМЛ.

Для того чтобы косвенно оценить, как изменяется активность НАДФН-оксидазы ПМЛ под влиянием салицилата натрия, метамизола натрия и диклофенака натрия у здоровых доноров и больных с непереносимостью данных препаратов, в следующей серии опытов исследовали изменение СЛЦХЛ выделенных ПМЛ под воздействием указанных препаратов. В исследование были включены те же пациенты и доноры, что и в случае исследования СЛХЛ суспензии ПМЛ. Результаты представлены на рисунках 1, б, 2, б, 3, б.

Как видно из рисунков, показатели относительной светосуммы СЛЦХЛ выделенных ПМЛ не имеют достоверных отличий у доноров и у пациентов с непереносимостью аспирина и/или метамизола натрия и/или диклофенака при воздействии на ПМЛ салицилата, метамизола и диклофенака натрия ($p > 0,1$).

Это косвенно свидетельствует о том, что активность НАДФН-оксидазы выделенных ПМЛ под влиянием используемых нами НПВП изменяется сходным образом у доноров и у пациентов с непереносимостью данных препаратов. Следует отметить, что салицилат и диклофенак натрия оказывают супрессирующее влияние на НАДФН-оксидазу ПМЛ доноров и лиц с непереносимостью этих препаратов, наиболее выраженное при воздействии на ПМЛ диклофенака натрия. Так, при концентрации диклофенака 2,5 ЭСТД развивается подавление СЛЦХЛ ПМЛ примерно на 40 – 60 %, в то время как при аналогичной концентрации салицилата натрия СЛЦХЛ ингибируется примерно на 10 – 30 %. При исследовании влияния метамизола натрия на СЛЦХЛ ПМЛ не было выявлено угнетения СЛЦХЛ ПМЛ в выбранном диапазоне концентраций. Это может свидетельствовать о том, что подавление суммарной выработки АФК ПМЛ под влиянием метамизола натрия в определяющей степени связано с угнетением активности миелопероксидазы ПМЛ, в то время как подавление суммарной выработки АФК

ПМЛ под влиянием диклофенака и салицилата натрия связано с угнетением активности обоих ферментов.

Полученные результаты показывают, что суммарная секреция АФК выделенными ПМЛ, в том числе и секреция $O_2^{\cdot -}$, у больных с непереносимостью НПВП не отличается от аналогичных показателей у доноров, что свидетельствует об отсутствии каких-либо особенностей в работе ферментов окислительного метаболизма под воздействием используемых нами НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов по сравнению с донорами. Из этого можно сделать вывод о том, что различия в показателях СЛХЛ цельной крови больных с непереносимостью НПВП по сравнению с донорами при прединкубации проб крови с НПВП [5] связаны с влиянием на ферменты окислительного метаболизма находящихся в плазме крови биологически активных веществ (медиаторов, цитокинов), 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 [7]. Более того, при непереносимости ацетилсалициловой кислоты аспирин провоцирует синтез и высвобождение лимфоцитами периферической крови 15-гидроксизйкозатетраеновой кислоты *in vitro*, стимулирует высвобождение гистамина из тромбоцитов, базофилов, тучных клеток [8]. Последнее подтверждается тем фактом, что у больных реакция на НПВП нередко сопровождается увеличением гистамина в плазме крови и его выведения с мочой [4]. Наше предположение об участии биологически активных веществ в подавлении СЛХЛ цельной крови под влиянием НПВП у больных с непереносимостью данных препаратов подтверждают также ранее полученные В. И. Пыцким и соавт. [10] данные об участии гистаминового механизма в подавлении СЛХЛ крови больных с непереносимостью аспирина и/или анальгина при инкубации проб крови с салицилатом натрия или анальгином. По-видимому, биологически активные вещества, воздействуя на ПМЛ, способны изменять активность ферментов окислительного метаболизма ПМЛ и, следовательно, модифицировать СЛХЛ крови. В частности, при изучении влияния гистамина, используемого в различных концентраци-

ях, на окислительный метаболизм ПМЛ было выявлено, что гистамин дозозависимо изменяет активность НАДФН-оксидазной и миелопероксидазной ферментных систем ПМЛ [2].

ВЫВОД

Показатели стимулированной люминол- и люцигенин-зависимой хемилуминесценции выделенных полиморфно-ядерных лейкоцитов под влиянием салицилата натрия, метамизола натрия, диклофенака натрия не имеют достоверных отличий ($p > 0,1$) у доноров и лиц с непереносимостью указанных препаратов, что свидетельствует об отсутствии каких-либо особенностей в работе ферментов окислительного метаболизма полиморфно-ядерных лейкоцитов под воздействием указанных нестероидных противовоспалительных препаратов у пациентов с непереносимостью данных препаратов по сравнению с донорами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина, *Усп. биологич. химии*, № 49, 341 – 388 (2009).
2. А. Ю. Искусных, О. В. Башарина, В. Г. Артюхов и др., *Вестн. ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*, № 1, 93 – 96 (2008).
3. В. И. Пыцкий, Ю. П. Сюсюкин, О. Ю. Филатов и др., А. С. 1436643 СССР (1988).
4. В. И. Пыцкий и др., *Аллергические заболевания*, 3-е изд., “Триада-Х”, Москва (1999).
5. С. В. Чаусова, Г. П. Бондарева, О. Ю. Филатов и др., *Тез. докл. 1-ая Нац. конф. РААКИ “Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммуно-фармакологии”*, Москва (1997), с. 441.
6. С. В. Чаусова, В. И. Пыцкий, Ю. В. Балякин и др., *Тез. докл. научно-практической конференции, посвященной 45-летию МБФ “Медико-биологические науки для теоретической и клинической медицины”*, Москва (2008), с. 99.
7. M. S. Kim, Y. J. Cho, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **4**(3), 137 – 142 (2012).
8. M. L. Kowalski, J. S. Makowska, *Allergy Clin. Immunol. Int. — J. World Allergy Org. Russ. Ed.* **2**(1), 12 – 22 (2007).
9. V. I. Pytsky, O. Ju. Filatov, and S. V. Chausova, *Abstrs. of the XVI Intern. Congr. Allergol. And Clin. Immunol.*, Cancum, Mexico (1997), p. 46.
10. V. I. Pytsky, O. Ju. Filatov, and S. V. Chausova, *Eur. J. of Clin. Che. & Clin. Biochem.*, **35**(9), 94 (1997).

Поступила 20.02.14

INFLUENCE OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON CHEMILUMINESCENCE OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH INTOLERANCE OF THESE DRUGS

S. V. Chausova¹, K. G. Gurevich², E. A. Usanova¹, E. E. Arutyunova¹, Yu. V. Balyakin¹, and I. Yu. Malyshev²

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia;

² Moscow State University of Medicine and Dentistry, ul. Delegatskaya 20/1, Moscow, 103473 Russia

We have studied the intensity of barium sulfate stimulated luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence (SLCHL and SLCCHL) in polymorphonuclear leukocytes (PML) after pre-incubation of PML suspension with sodium salicylate, sodium metamizole, or sodium diclofenac at various concentrations in healthy donors and patients with intolerance to aspirin, and/or sodium metamizole, and/or sodium diclofenac. No significant differences of SLCHL and SLCCHL indicators in PML isolated from healthy donors and patients with intolerance to these drugs have been found, which indirectly indicates the absence of any specific features in the oxidative metabolism of PML enzymes under the influence of indicated NSAIDs in patients intolerant of these drugs as compared to donors.

Keywords: chemiluminescence, polymorphonuclear leukocytes, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), NSAIDs intolerance