

*К.М.Алиева, А.Р.Татарский, Е.Н.Арсеньева, Л.П.Быкова, Б.И.Круглый,
В.Г.Пинелис, А.Г.Чучалин*

СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ. ВЛИЯНИЕ ТРОМБОЦИТАФЕРЕЗА

НИИ пульмонологии МЗ РФ, НИИ педиатрии РАМН

THE CONTENT OF TROMBOCYTE ACTIVATION FACTOR IN SERUM OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA. THE TROMBOCYTAPHERESIS INFLUENCE

K.M.Alieva, A.R.Tatarskiy, E.N.Arsenieva, L.P.Bykova, B.I.Kruglyi, V.G.Pinelis, A.G.Chuchalin

Summary

Levels of serum PAF were investigated in patients with various bronchial asthma (BA) forms and in various forms of the clinical manifestation of the disease before and after plateletapheresis (PtA). 15 patients with BA (9 atopic and 6 aspirin-sensitive ones) and 4 healthy donors were examined. The examination demonstrated that only tracks of PAF in the healthy donors are registered but in BA patients the PAF levels were significantly increased. It was found, that in patients with atopic BA the PAF levels were almost by two times higher than in aspirinic BA ones. Moreover, the PAF level in a great extent depends on the disease degree. The serum PAF level was decreased in 42% in average after trombocytapheresis.

The study demonstrates the features of thrombocytapheresis action and develops the imagination about its action mechanisms.

Резюме

Исследовался уровень фактора активации тромбоцитов (ФАТ) в крови больных различными формами бронхиальной астмы разной степени тяжести и влияние тромбоцитафереза на этот показатель. Обследовано 15 больных с БА (9 с атопической и 6 с аспириновой) и 4 здоровых донора. Исследования показали, что в крови здоровых доноров регистрируются лишь следы ФАТ, тогда как у больных БА содержание ФАТ значительно повышено. Выявлено, что у больных аспириновой астмой уровень ФАТ почти в 2 раза ниже, чем в группе больных атопической астмой. Кроме того, чем тяжелее протекает заболевание, тем выше уровень ФАТ. После тромбоцитафереза уровень ФАТ в крови больных, получавших данную терапию, снизился в среднем на 42%.

Исследования раскрывают особенности действия тромбоцитафереза, углубляют представления о механизме действия этой процедуры.

Среди медиаторов бронхиальной астмы (БА) особое место принадлежит фактору активации тромбоцитов (ФАТ), его «priming» эффекту, приводящему к активации клеток в дыхательных путях с образованием вторичных медиаторов и обладающему широким спектром биологической активности [3]. J.Morley (1984) основываясь на выраженном бронхоконстрикторном эффекте ФАТ выдвинул гипотезу, что ФАТ и тромбоциты играют центральную роль в развитии БА. Существует большое число исследований, которые подтверждают роль ФАТ как медиатора БА и гиперреактивности дыхательных путей [9,11,15]. В легких ФАТ выделяется эндотелиальными клетками, альвеолярными макрофагами, лейкоцитами, эозинофилами, базофилами, тромбоцитами, эпителиальными клетками [9,14]. Основными источниками базального уровня ФАТ в организме являются легкие, почки, печень, фагоцитирующие клетки крови [12].

Цель настоящей работы — исследование уровня ФАТ в крови больных БА в зависимости от формы и стадии болезни и влияния нового экстракорпорального метода лечения тромбоцитафереза на изучаемый показатель.

Под нашим наблюдением находились 15 пациентов — 9 больных атопической — АБА (4 мужчины, 5 женщин) и 6 больных аспириновой бронхиальной астмой — АсБА (2 мужчин, 4 женщины) в возрасте 18—60 лет. Контрольную группу составили 4 здоровых донора. Большинство обследованных больных АБА (6 человек) страдало среднетяжелой формой заболевания, у 1 больной установлено тяжелое, у 2 больных — легкое течение БА. 4 больных АБА находились в стадии обострения болезни, 5 больных — в дебюте ремиссии. Длительность заболевания у большинства больных превышала 5 лет. Проявления немедленной гиперчувствительности отмечались у всех обследованных АБА: по результатам скарификационных проб и уровня аллергенспецифического IgE в четырех случаях выявлялась гиперчувствительность к бытовым аллергенам, в одном случае — к пыльцевым, в одном случае — к бытовым и эпидермальным аллергенам. Комбинированная гиперчувствительность к трем и более видам аллергенов была выявлена у трех больных. Из сопутствующих заболеваний полинозом страдало 4 больных, атопическим дерматитом — 1, рецидивирующими отеками Квинке — 1 больная. На момент обследования все

больные получали общепринятую терапию, включающую ксантины, отхаркивающие. Из них 3 получали пероральную глюкокортикоидную терапию коротким курсом (преднизолон в дозах 15 мг/сут), лишь 1 больная находилась на постоянной глюкокортикоидной терапии в течение двух лет в дозах от 10 до 15 мг/сут в пересчете на преднизолон.

Из шести больных АсБА 5 человек страдали средне-тяжелой формой заболевания, у 1 больной отмечалось тяжелое течение болезни. У 3 больных было обострение, у 3 — дебют ремиссии заболевания. Все обследованные больные АсБА наряду с традиционной терапией получали глюкокортикоиды: из них 3 находились на постоянной гормональной терапии в течение 1,5—6 лет и принимали 10—20 мг/сут в пересчете на преднизолон, 3 — курсами лишь в период обострения заболевания парентерально и перорально.

Учитывая возможное ингибирующее влияние ксантинов и глюкокортикоидов на уровень циркулирующего в крови ФАТ, за 24 часа до исследования отменяли парентеральное введение и пероральный прием этих лекарственных препаратов. Венозную кровь из локтевой вены забирали в охлажденную до 4°C пластиковую пробирку с 0,13 М цитратным буфером в соотношении 9:1. Центрифугировали при 3000 об/мин при 4°C в течение 5 мин. Отбирали 0,9 мл плазмы и немедленно проводили экстракцию фосфолипидов плазмы крови [2]. К 0,9 мл плазмы добавляли хлороформ и метанол в соотношении 0,9:1:2. Однородную фазу инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Добавляли хлороформ, метанол, H₂O в соотношении 1:1:0,9. После отделения фазы производили перемешивание. Отбирали верхнюю хлороформную фазу, после чего повторно добавляли 1,8 мл хлороформа, осторожно перемешивали, отбирали верхнюю фазу и объединяли с 1 фазой при комнатной температуре, которые выпаривали под током азота. Затем определяли ФАТ радиоиммунологическим методом при помощи высокочувствительных коммерческих наборов фирмы «Amersham». Определение количества H³-РАФ, связанных с флюоросфераном, проводили путем счета в В-сцинтилляционном счетчике («Beckman»). Содержание ФАТ в крови выражалось в пг/мл.

Тромбоцитаферез проводили с использованием сепаратора крови Fenwall CS-3000 (США). Объем перфузированной крови составлял 5—7 литров, количество удаляемых тромбоцитов зависело от объема перфузии и колебалось от 4,5 до 6,0 · 10¹¹, что соответствовало 48—60% от всех циркулирующих тромбоцитов. Исследование ФАТ в плазме крови проводилось через сутки после тромбоцитафереза.

Полученные результаты обрабатывали с помощью общепринятых методов математической статистики, включая оценку по критерию t Стьюдента.

Исследования показали, что у здоровых лиц в плазме крови регистрируются следы ФАТ. У больных БА содержание ФАТ в крови было повышено как в стадии обострения, так и в ремиссии. Средний уровень ФАТ при АБА составил 2024,37 ± 350,2 пг/мл. У больных, находящихся в стадии обострения, уровень ФАТ достигал 3682,7 ± 487,9 пг/мл, в ремиссии — 697,8 ± 154,9 пг/мл., т.е. уровень ФАТ в обострении превышал таковой в ремиссии в среднем в 5 раз. Максимальные значения ФАТ выявлены у больных

АБА с комбинированной гиперчувствительностью к нескольким видам аллергенов и сопутствующими аллергическими заболеваниями. Было отмечено, что у больных АБА имеется связь между уровнем ФАТ и тяжестью заболевания — чем тяжелее протекает заболевание, выраженнее степень сенсибилизации и степень бронхообструкции, тем выше уровень ФАТ. Повышение уровня циркулирующего ФАТ с увеличением степени бронхообструкции, по-видимому, является одним из патогенетических механизмов бронхальной обструкции.

У больных АсБА среднее содержание ФАТ в плазме крови составило 1156,05 ± 257,4 пг/мл, что в 1,8 раза ниже аналогичных значений больных АБА. При этом у больных, находящихся в периоде обострения, средние значения ФАТ составили 1910,7 ± 310,6 пг/мл, в ремиссии — 401,4 ± 80,8 пг/мл. Таким образом, при АсБА, так же как и при АБА, уровень ФАТ в обострении превышал таковой в ремиссии в среднем в 5 раз ($p < 0,01$). Интересно, что у двух больных АсБА, постоянно получающих глюкокортикоидные препараты, отмечено низкое содержание циркулирующего ФАТ (менее 200 пг/мл). Возможно, это связано с характером и объемом проводимой глюкокортикоидной терапии, индивидуальной чувствительностью организма к этим препаратам, а также, очевидно, их ингибирующим влиянием на продукцию ФАТ в организме.

Представляло интерес исследование влияния процедуры тромбоцитафереза на уровень ФАТ в крови больных БА. С этой целью было обследовано 4 больных с АсБА. Для процедуры были отобраны больные с наиболее высоким содержанием ФАТ в крови. Исследование ФАТ в крови через сутки после проведения тромбоцитафереза показало значительное понижение его уровня у 2 больных, причем в одном случае уровень ФАТ понизился на 42%, в другом случае ФАТ практически не определялся. У двух больных содержание ФАТ в крови через сутки после процедуры не изменилось. Оценивая влияние тромбоцитафереза на уровень ФАТ в крови, следует учитывать, что тромбоциты являются лишь одним из источников образования ФАТ в организме, поэтому удаление пула циркулирующих тромбоцитов, по-видимому, в некоторых случаях не способно существенно повлиять на его циркуляцию в крови, что свидетельствует о сложности механизмов регуляции выделения ФАТ в организме, которые связаны, в частности, с модулирующими влияниями различных цитокинов [4,8].

Таким образом, проведенные исследования показали, что у больных БА уровень ФАТ в крови резко повышен, что указывает на важную роль ФАТ в развитии и поддержании заболевания. Максимальное содержание ФАТ в плазме крови было отмечено при АБА. Уровень ФАТ в стадии обострения в среднем в 5 раз превышал таковой в ремиссии. Полученные результаты свидетельствуют о патогенетической роли ФАТ в развитии и утяжелении течения БА, особенно ее атопической формы, и согласуются с данными T.Nakamiga et al. (1987), показавшими повышение ФАТ в крови больных БА во время позднего астматического ответа, развивающегося после аллергенной стимуляции.

Результаты исследования позволяют предполагать, что ФАТ является медиатором как АБА, так и

неиммунологической БА. Он участвует в многочисленных реакциях через усиление или ослабление различных клеточных ответов. Через тромбоцитопосредованный механизм ФАТ активирует эозинофилы с выделением цитотоксичных медиаторов (в т.ч. ФАТ), которые вновь привлекают эозинофилы, инфильтрирующие дыхательные пути и повреждающие эпителий, что ведет к потере эпителиального фактора релаксации, обнажению ирритантных рецепторов и усилению бронхиальной гиперреактивности [4,5,13].

Недавно D.Hosford et al. (1990) выдвинули гипотезу о феномене так называемого предвоспаленного легкого, являющегося основой сенсibilизации и выявляемого при активации клеток-мишеней. Последними могут быть, в частности, альвеолярные макрофаги, выделяющие ФАТ, ТхА₂, IL-1, запускающие аккумуляцию, активацию клеток с выделением цитотоксических медиаторов и последующие изменения в дыхательных путях. Высокий уровень ФАТ в крови больных бронхиальной астмой поддерживает порочный круг активации различных клеточных популяций и выделение ими многочисленных медиаторов, ответственных за развивающиеся изменения в дыхательных путях [3].

Изучение уровня ФАТ под влиянием тромбоцитафереза у больных АсБА показало, что в половине случаев уровень ФАТ существенно понизился, у другой половины больных динамика ФАТ отмечено не было. Однако для окончательного ответа на вопрос о влиянии тромбоцитафереза на уровень ФАТ в крови необходимы дополнительные исследования. Исследованиями A.Lelouch—Tubiana et al. (1987), A.Coyle (1990) было показано, что введение антитромбоцитарной сыворотки, индуцирующей тромбоцитопению у экспериментальных животных, уменьшает аккумуляцию эозинофилов в дыхательных путях и приводит к уменьшению гиперреактивности бронхов. Очевидно, что тромбоцитаферез, выключая из циркуляции пул функционально и морфологически измененных тромбоцитов, секретирующих различные биологически активные вещества, и вызывая обновление его пулом клеток с нормальными морфофункциональными характеристиками [1], разрывает порочный круг межклеточных взаимо-

действий, поддерживающих аллергическое воспаление и бронхиальную гиперреактивность. Представляется необходимым дальнейшее исследование ФАТ, а также цитокинов для углубления знаний о механизмах терапевтической эффективности тромбоцитафереза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиева К.М. Нарушения морфофункционального состояния тромбоцитов и их коррекция методом тромбоцитафереза у больных атопической и аспириновой бронхиальной астмой: Дис. ... канд. мед. наук.— М., 1992.
2. Bleigh E.E., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.*— 1959.— Vol.37.— P.911—917.
3. Braquet P., Chabrier P.E., Mencia-Huerta J. The promise of PAF—antagonists // *Adv. Inflamm. Res.*— 1987.— Vol.16.— P.179—198.
4. Coyle A., Page C. Regulation of PAF-induced eosinophilic infiltration // *PAF in Immune Responses and Renal Diseases* / Ed. P. Braquet.— Amsterdam, 1989.— P.16—21.
5. Coyle A.J., Page C.P., Atkinson L. The requirement for platelets in allergen-induced late asthmatic airway obstruction // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1990.— Vol.142, N3.— P.587—593.
6. Hosford D., Mencia-Huerta J., Braquet P. Platelet-activating factor (PAF) and PAF antagonists in asthma // *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.*— 1990.— Vol.17, N3.— P.261—273.
7. Lelouch-Tubiana A., Lefort A. Interaction between granulocytes and platelets with the guinea pig lung in passive anaphylactic shock. Correlation with paf-acether induced lesions // *Int. Arch. Allergy.*— 1987.— Vol.83.— P.198—205.
8. Makino S. Roles of PAF and lymphocytes in antigen—induced eosinophil infiltration in the bronchial mucosa in sensitised guinea pigs // *PAF in Immune Responses and Renal Diseases* / Ed. P. Braquet.— Amsterdam, 1989.— P.72—79.
9. Mc Manus L., Deavers S. PAF in pulmonary pathobiology // *Clin. Chest Med.*— 1989.— Vol.10, N1.— P.107—118.
10. Morley J., Page C.P. Platelets in asthma // *Lancet.*— 1984.— Vol.2.— P.1142—1144.
11. Nakamura T., Morita G., Kuriyama M. et al. Platelet activating factor in Late asthmatic Response // *Int. Arch. Allergy.*— 1987.— Vol.82.— P.57—61.
12. PAF in Asthma / Eds. G.Holme., J.Morley.— London: Acad. Press, 1989.— P.375.
13. Page C.P., Coyle A.J. Platelets, eosinophils and asthma. // *Eur. Respir. J.*— 1989.— Vol.2, Suppl.6.— P.483s—487s.
14. Salari H., Wong A. Generation of PAF by human lung epithelial cell line // *Eur. J. Pharmacol.*— 1990.— Vol.175, N3.— P.253—259.
15. Smith L. The role of PAF in asthma // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1991.— Vol.143, N5.— Pt.2.— P.s100—s102.

Поступила 08.07.93.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.248—616.155.2—0727

А.Р.Татарский, А.С.Эмирова, Е.В.Бобков, К.М.Алиева

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

THE STUDY OF THE FUNCTIONAL STATUS OF TROMBOCYTES IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF BRONCHIAL ASTHMA.

A.R.Tatarskiy, A.S.Emirova, E.V.Bobkov, K.M.Alieva

S u m m a r y

The functional status of platelets (Pt's) was investigated characterized the activity extent of cells and their role in bronchial asthma (BA) pathogenesis. The trombocytal aggregation, the intracellular calcium metabolism,