

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 612.032.344]078

СОПРЯЖЕННОСТЬ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В МЕХАНИЗМАХ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ БРОНХОВ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

В.Г. АМАТУНИ, К.Л. МАЛАЯН

Кафедра внутренних болезней педиатрического, санитарного и стоматологического факультетов
Ереванского медицинского института

Проведено сравнительное изучение кальциевого гомеостаза, кальций-регулирующей системы и перекисного окисления липидов у 16 больных бронхиальной астмой (БА) при бронхоспазме физического усилия (БФУ) и у 15 больных в астматическом приступе и 69 больных в межприступном периоде.

Полученные результаты указывают на тесную патогенетическую связь между изменениями кальциевого гомеостаза, гормональной кальцийрегулирующей системой и усилением ПОЛ в возникновении гиперреактивности бронхиального дерева и БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, Ca^{2+} , перекисное окисление липидов, гиперреактивность.

Введение. Исследованиями последнего десятилетия [1-3] было показано, что общим для всех форм бронхиальной астмы (БА) патогенетическим механизмом является повышенная реактивность бронхов иммунного и неиммунного происхождения. Установлено также, что ионизированный кальций (Ca^{2+}), являющийся ключевым медиатором клеточных функций [4] участвует в заключительном этапе формирования многих патологических процессов, включая приступ БА, а увеличение его цитоплазматической концентрации в мастоцитах и гладких мышечных волокнах бронхов повышает активацию и дегрануляцию первых и сокращение вторых [5-7].

Функциональная активность кальциевых каналов клеточных мембран, процессы входа в клетку Ca^{2+} и выхода его из внутриклеточного депо регулируются паратгормоном (ПТГ), кальцитонином (КТ) и витамином Д при участии кальмодулина, витамин Д-зависимого кальций-связывающего белка и цАМФ [8-10]. Внеклеточный кальциевый гомеостаз осуществляется также гормонами (ПТГ и КТ) и витамином Д, оказывающим влияние на процессы резорбции и отложения Ca^{2+} в кости, реабсорбцию Ca^{2+} и фосфата в почках и всасывание в кишечнике [11]. С другой стороны транспорт Ca^{2+} определяется составом липидного матрикса мембран, изменения которого связаны с активностью перекисного окисления мембранных фосфолипидов (ПОЛ) [12].

В связи с изложенным представляется важным сравнительное изучение при бронхоспазме физического усилия (БФУ) и астматическом приступе кальциевого гомеостаза, кальцийрегулирующей системы и ПОЛ, имеющими прямое отношение к молекулярно-клеточным механизмам дегрануляции тучных клеток, реактивности гладких мышц бронхов. Имеющиеся в литературе крайне скудные данные об изменениях содержания в сыворотке крови Ca^{2+} у здоровых лиц после субмаксимальной физической нагрузки [13] говорят об его увеличении и отсутствии существенной разницы в концентрации Ca^{2+} до и после нагрузки на тредмиле у больных БА [14].

Методика. Физическая нагрузка осуществлялась в соответствии с рекомендациями ВОЗ по проведению нагрузочных проб на велоэргометре при мощности 60 Вт в течение 5 мин. До нагрузки и через 10 мин после нее производили спирографию на пневмоскрине фирмы "Erich Jaeger" (ФРГ). В сыворотке крови определялись Ca^{2+} , кальций общий ($Ca^{общ}$), КТ и ПТГ. Содержание Ca^{2+} определялось ионоселективными кальциевыми электродами на автомат-анализаторе фирмы "Kone" (Финляндия), $Ca^{общ}$ — фотометрическим методом с использованием тест-наборов на автомат-анализаторе фирмы "Labsystems" (Финляндия), содержание КТ и ПТГ определялось радиоиммунологическим методом с использованием стандартных тест-наборов. Гидроперекиси (ГП) в

плазме крови определялись спектрофотометрическим методом Гаврилова В.Б. и Мешкорудной М.И. [15]. Помимо этого определялись расчетные величины: кальций связанный ($\text{Ca}^{\text{связ}}$) и % Ca^{2+} от $\text{Ca}^{\text{общ}}$.

В экспериментальных исследованиях с введением 50 белым крысам-самцам внутрибрюшинно 0,1 мл перексидированной линоленовой кислоты (перекисное число - 380) определялась степень дегрануляции тучных клеток брыжѳеки, содержание в них гистамина флюорометрическим методом и Ca^{2+} с помощью хлортетрациклинового зонда [16], а также ГП в плазме крови через 1 час, 24 часа, на 3 и 7 сутки после инъекции.

Исследования проведены на 16 больных БА (10 мужчин, 6 женщин) в возрасте от 19 до 50 лет. Все больные страдали инфекционно-зависимой БА средней тяжести (ИЗБА-П) в фазе затухающего обострения.

По реакции на физическую нагрузку больные были распределены на 2 группы. В I группу вошли 9 больных ИЗБА-П с нарушением вентиляционной функции легких (ВФЛ) II степени, у которых объем форсированного выхода за 1 сек (ОФВ_1) составлял 43,8%-68,3% от должной (в среднем 57,9%). После физической нагрузки у них развился умеренный бронхоспазм с уменьшением ОФВ_1 на 12,3%-22,4% (в среднем на 14,5%). Во II группу вошли 7 больных ИЗБА-П с нарушением ВФЛ II ст. и % ОФВ_1 от должной 39,4%-64,5% (в среднем 58,7%) отрицательной провокационной пробой, у которых изменения ОФВ_1 после физической нагрузки колебались от -3% до +2,3%.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования (таблица 1) показали, что содержание Ca^{2+} в I группе больных до физической нагрузки было выше на 10,7% ($p < 0,001$), чем в контрольной группе и на 8,6% ($p < 0,05$) по сравнению со II группой больных. Содержание Ca^{2+} во II группе больных не отличалось от контроля. % Ca^{2+} от $\text{Ca}^{\text{общ}}$ до физической нагрузки был наибольшим в I группе больных: на 8,8% выше контроля и на 5,7%* выше, чем у больных II группы. Во II группе больных % Ca^{2+} от $\text{Ca}^{\text{общ}}$ не отличался от контроля. Содержание $\text{Ca}^{\text{общ}}$ и $\text{Ca}^{\text{связ}}$ до физической нагрузки было нормальным и примерно одинаковым в обеих группах.

Таблица 1

Изменение в содержании кальция и гидроперекисей в крови ($M \pm m$) у больных БА с положительной (I группа) и отрицательной (II группа) провокационной пробой, в приступе астмы (А) по сравнению с межприступным периодом (Б)

Группы исследования	Статистические показатели	Ca^{2+} ммоль/л	$\text{Ca}^{\text{общ}}$ ммоль/л	$\text{Ca}^{\text{связ}}$ ммоль/л	% Ca^{2+} от $\text{Ca}^{\text{общ}}$	ГП нм/мг белка
I группа n=9	До нагрузки	1,13±0,04	2,34±0,06	1,20±0,03	48,2±6,7	5,2±0,4
	% откл. от контр.	+10,7	+1,7	-5,6	+8,8	+136,3
	После нагрузки	1,04±0,0	2,20±0,07	1,15±0,05	47,2±5,4	7,9±0,5
	% откл. от исходн.	-8	-6	-4,2	-2,1	+52,0
II группа n=7	До нагрузки	1,04±0,05	2,28±0,01	1,25±0,06	45,6±6,7	4,1±0,3
	% откл. от контр.	+1,9	-0,9	-1,6	+2,2	+86,2
	После нагрузки	1,10±0,04	2,26±0,03	1,18±0,04	48,7±6,3	5,7±0,4
	% откл. от исходн.	+5,7	-0,4	-5,6	+5,1	+39,0
А n=15 Б n=69	Приступ астмы	1,05±0,04	2,10±0,01	1,05±0,02	51,3±2,7	9,2±0,3
	Межприст. период	1,13±0,02	2,29±0,04	1,15±0,02	50,0±2,3	6,9±0,4
	% откл. от межприступного периода	-7,1	-8,3	-8,7	+2,6	+33,3
Контроль	До нагрузки	1,02±0,02	2,30±0,05	1,27±0,04	44,3±4,7	2,2±0,2
	После нагрузки	1,19±0,04	2,47±0,04	1,26±0,05	48,1±4,9	3,0±0,3
	% откл. от исходн.	+16,6	+7,3	-0,2	+8,5	+41,0

После физической нагрузки содержание Ca^{2+} в I группе больных достоверно уменьшилось на 8% ($p < 0,05$) по сравнению с повышенной исходной величиной, тогда как во II группе оно увеличилось на 5,7% ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем, близким к нормальному. В контрольной группе после нагрузки содержание Ca^{2+} оказалось увеличенным на 16,6% ($p < 0,001$). Следовательно, физиологической реакцией организма на мышечную нагрузку является значительное увеличение содержания в крови

Ca^{2+} , реакция же больных без БФУ ближе к группе здоровых, чем больных I группы. Сопоставление описанных результатов в I группе больных с данными, полученными при приступе бронхиальной астмы (таблица 1), показало их полную идентичность, что указывает на связь снижения Ca^{2+} в крови после нагрузки только с бронхоспазмом, независимо от его происхождения и провоцирующего момента. Причем этот сдвиг при БФУ должен быть достаточно выраженным, поскольку он перекрывает противоположную тенденцию, четко проявляющуюся у лиц здоровых под влиянием одной физической нагрузки.

Интенсивность ПОЛ по содержанию ГП в крови до нагрузки (таблица 1) увеличивается в прямой зависимости от состояния реактивности бронхов в группах от контрольной до I-ой (от $2,2 \pm 0,2$ до $5,2 \pm 0,4$) и у больных отличается от нормального уровня на 136,3% в I группе и на 86,2% во II группе ($p < 0,001$). Прирост ГП после физической нагрузки также оказался в прямой зависимости от состояния реактивности бронхов: в I группе — на 52%, во II группе — на 39% и в контрольной — на 41% ($p < 0,01$).

Из приведенных данных следует, что сама мышечная нагрузка у здоровых лиц вызывает значительное усиление ПОЛ, равное наблюдаемому в группе больных без бронхоспазма. Наибольшая степень прироста ГП в I группе больных (на 52%), следовательно, является результатом участия дополнительного механизма, обусловленного бронхоспазмом. Из таблицы 1 следует, что увеличение в крови ГП наблюдается и при астматическом приступе, однако оно значительно меньше (16,6%, $p < 0,01$), чем при БФУ, поскольку при этом отсутствует фактор физической нагрузки, активизирующий ПОЛ и провоцирующий бронхоспазм.

Приведенные данные могут быть рассмотрены в плане участия ПОЛ в стрессорной реакции организма на мышечную нагрузку, бронхоспазм и астматический приступ, как явление неспецифического, составляющего часть адаптационного синдрома. С другой же стороны бронхоспастическая реакция, как и спазм гладкой мускулатуры вообще, связывается с усилением трансмембранного потока Ca^{2+} и повышением его концентрации в саркоплазме [7], а в механизмах последнего важную роль играют активация ПОЛ мембран и изменения в клеточных мембранах, приводящие к снижению их кальцийсвязывающей способности и повышению функциональной активности кальциевых каналов [12].

Расчеты показали, что между изменениями Ca^{2+} и ГП в I группе больных после физической нагрузки имеется обратная корреляционная зависимость ($r = -0,68$, $p < 0,001$), в то время как во II-ой и в контрольной группах она отсутствует ($r = -0,47$, $r = -0,16$). Высокая корреляционная зависимость между ними была обнаружена и у больных в астматическом приступе ($r = -0,8$), что указывает на тесную патогенетическую связь снижения в крови Ca^{2+} с усилением ПОЛ при астматическом приступе и БФУ немунного генеза, идентичные друг другу в метаболическом звене.

О наличии прямой связи дегрануляции тучных клеток у больных БА с усиленным ПОЛ говорят наши экспериментальные исследования с внутрибрюшинным введением животным 0,1 мл пероксидированной линоленовой кислоты [2]. При изучении обусловленности этого феномена кальциевыми механизмами было установлено, что в течение всего времени эксперимента имела место выраженная дегрануляция тучных клеток с понижением в них содержания гистамина (Г) и кумуляцией Са-хлортетрациклинового комплекса (ХТК), максимальная через сутки после начала эксперимента (снижение ГП на 60,9%, увеличение ПТК на 78,7%). Содержание ГП в крови оказалось максимальным в те же сроки, что говорит о взаимосвязанности усиления ПОЛ, дегрануляции тучной клетки и накопления в них Ca^{2+} ($r = -0,84$, $p < 0,001$). Таким образом, усиленный поток Ca^{2+} внутрь клеток в астматическом приступе может быть обусловлен резко усиливающимся ПОЛ клеточных мембран. Очевидно, что именно эти мембранно-клеточные механизмы, главным образом, ответственны и за снижение содержания Ca^{2+} в крови при БФУ и в приступе астмы.

Из вышеизложенного следует, что усиленное ПОЛ мембран является не только одним из проявлений неспецифического адаптационного синдрома, но и имеет непосредственное отношение к специфическим механизмам патогенеза приступа БА.

Таблица 2

Изменения в содержании КТ и ПТГ в сыворотке крови ($M \pm m$) после нагрузки у больных БА с положительной (I группа) и отрицательной (II группа) провокационной пробой в приступе астмы (А) по сравнению с межприступным периодом (Б)

Группы исследования	Статистические показатели	КТ пг/мл	ПТГ мг/мл	КТ/ПТГ
I группа n=9	До нагрузки	24,54±6,8	66,71±4,2	0,36±0,09
	% откл. от контр.	+50,7	+86,3	-20
	После нагрузки	36,22±10,7	78,36±6,2	0,46±0,08
	% откл. от исходн.	+47,5	+17,4	27,7
II группа n=7	До нагрузки	18,22±5,4	44,51±5,6	0,40±0,1
	% откл. от контр.	+11,9	+24,3	-11,2
	После нагрузки	29,32±10,4	52,66±7,2	0,55±0,07
	% откл. от исходн.	+60,9	+18,3	+37,5
Контрольная группа	До нагрузки	16,28±7,1	35,82±4,3	0,45±0,02
	После нагрузки	53,26±19,4	48,89±6,1	1,08±0,009
	% откл. от исходн.	+227,0	+36,4	+140*
А n=15 Б n=69	Приступ астмы	-Е	77,20±4,8	
	Межприст. период	12,45±7,1	45,81±3,5	
	% откл. от межпр. периода		68,5	

Определение концентрации кальций-регулирующих гормонов в сыворотке крови до нагрузки (таблица 2) показало, что уровень ПТГ в I группе больных выше контрольной величины на 86,2% и на 49,9% выше, чем во II группе ($p < 0,05$). Содержание КТ в I и II группах не отличалось от нормы. После физической нагрузки концентрации КТ и ПТГ повышаются во всех группах больных и у здоровых. Наибольший их прирост наблюдается у здоровых лиц (+227%, +36,4%), значительно меньше он во II и I группах: по КТ на +60,9% и +47,5%* по ПТГ — на +18,3% и -17,4%. Как видно, увеличение КТ и ПТГ происходит не в одинаковой степени: отмечается заметное преобладание КТ, (увеличение отношения КТ/ПТГ во всех группах исследования) наибольшее в контрольное группе и в значительно меньшей степени в обеих группах больных. Следовательно, мышечная нагрузка у здоровых лиц вызывает физиологическое увеличение продукции КТ и в меньшей степени увеличение ПТГ. В обеих группах больных увеличение гормонов в крови значительно меньше, чем у здоровых при более низком соотношении КТ/ПТГ и меньшем его увеличении после нагрузки. Очевидно, наличие заболевания заметно ограничивает физиологическую реакцию на мышечную нагрузку со стороны кальцийрегулирующих гормонов. Помимо этого оказалось, что высокой гиперреактивности бронхов I группы соответствует значительно более высокий уровень ПТГ в крови, чем у больных II группы, и у больных вообще, чем у здоровых. Изменения КТ у больных в сравнении со здоровыми незначительные, в связи с чем отношение КТ/ПТГ у них заметно ниже. Наиболее низкое оно в I группе (0,36) и наиболее высокое у здоровых (0,45), что указывает на определенное преобладание ПТГ над КТ у больных с БФУ. Что касается изменений со стороны кальций-регулирующих гормонов в приступе БА, когда влияния мышечной нагрузки нет вовсе, то увеличение ПТГ на 68,5% от межприступного периода при этом сопровождается на столько резким снижением содержания КТ, что он не определялся в крови даже самым чувствительным фотометрическим методом. Последнее вновь указывает на идентичность изменений ПТГ и КТ при приступе БА и БФУ и важность нарушения гормональной регуляции мембранно-клеточных механизмов кальциевого гомеостаза в патогенезе гиперреактивности бронхов.

Анализ материала показывает, что высокой гиперреактивности бронхов больных I группы соответствуют повышенные до нагрузки уровни Ca^{2+} , ПТГ относительно КТ в сыворотке крови и более высокое, чем во II группе содержание ГП.

После физической нагрузки отмечается достоверное снижение уровня Ca^{2+} при наибольшем усилении ПОЛ и одновременном увеличении КТ, обусловленное мышечной

нагрузкой, и ПТГ, обуславливающее повышение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} и гиперреактивность бронхов. Эффект гиперпаратгормонемии более отчетливо виден в приступе БА, когда КТ практически отсутствует в крови. Сама мышечная нагрузка (группа здоровых лиц) вызывает заметное увеличение Ca^{2+} , $Ca^{общ.}$ и % Ca^{2+} от $Ca^{общ.}$, при существенном усилении ПОЛ и увеличении содержания кальцийрегулирующих гормонов, главным образом КТ с резким преобладанием его над ПТГ.

Увеличение Ca^{2+} после физической нагрузки у здоровых лиц объясняется снижением рН сыворотки крови за счет гиперпродукции лактата в мышцах, приводящей к уменьшению сродства Ca^{2+} с белками крови [13,17]. Изменения показателей во II группе больных занимают промежуточное место между I группой больных и группой здоровых, отражая их двойную обусловленность мышечной нагрузкой и бронхоспазмом.

Проведенные клинические и экспериментальные исследования свидетельствуют о тесной связи описанных изменений кальциевого обмена с реакцией со стороны кальцийрегулирующих гормонов и активацией ПОЛ, которые известны как стрессреализующие факторы общего адаптационного синдрома. Однако они участвуют и в наиболее специфичном для БА механизме повышения реактивности бронхиального дерева к бронхоконстрикторным влияниям, обусловленном увеличением содержания Ca^{2+} в цитоплазме гладких мышечных волокон бронхов и тучных клеток.

Приведенные результаты указывают также на то, что нет прямой связи между гиперреактивностью и тяжестью клинико-патологических проявлений заболевания. В значительно большей степени реактивность бронхов определяется состоянием метаболических функций. Эти результаты являются новым подтверждением наших предшествующих исследований [18-20], показавших, что реактивность бронхов больных БА находится в соответствии с реактивностью физиологических систем организма, ответственных за продукцию гистамина, катехоламинов, активацию ПОЛ, общими для БФУ неиммунологического происхождения и для приступа бронхиальной астмы.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Федосеев Г.Б., Жихарев С.С., Минеев В.В. и др. // Тер. архив. — 1984. — № 12. — С. 71-74.
- 2 Aas. K. // Asthma and Bronchial Hyperreactivity. — Basel. — 1985. — P. 224-234.
- 3 Biouchev H.A., Holzman M.J., Sheller T.B. et al. // Amer. Rev. Resp. Dis. — 1980. — V. 121. — P. 389-413.
- 4 Скрайвер К.Р., Фрайзер Д., Кух С.В. // В кн.: Нарушения обмена кальция. — М. — 1985. — С. 9-64.
- 5 Гуцин И.С., Горячкина Л.А., Фролова М.К. // Тер. архив. — 1984. — № 12. — С. 110-118.
- 6 Middleton E.J. // J. Allergy. — 1985. — V. 676. — P. 341-346.
- 7 Triggler D.Y. // J. Allergy. — 1983. — V. 63. — P. 1-9.
- 8 Држеветская И.А., Држеветский Ю.М. // Гормональная регуляция обмена кальция и секреторные процессы. — М. — 1983.
- 9 Орлов Р.С., Барабанова В.С. // Успехи физиол. наук. — 1978. — Т.9. — №2. — С. 76-80.
- 10 Borle A.B. // Clin. Orthop. — 1967. — V. 52. — P. 267-291.
- 11 Лукас П.А., Видхед Дж. С // Нарушения обмена кальция. — М. — 1985. — С. 9-64.
- 12 Меерсон Ф.З. // Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
- 13 Foriolo A.Y., Mather D.H., Dada O.A. // J. Sport. Med. — 1986. — V. 26. — P. 5-7.
- 14 Jugger M., Staubli M., Peheini E., Bachofen H. // J. Appl. Physiol. — 1988. — P. 1354-1358.
- 15 Гасрилов В.В., Мешкорудная М.И. // Лабор. дело. — 1983 — №3. — С.10-12.
- 16 Зильфян А.В. // Определение ионизированного кальция в тучных клетках. — Ереванский мед. институт, рационализаторское предложение. — № 132. — 1982.
- 17 Zawoda Y.P., Chernow B. // JAMA. — 1986. — V. 256. — P. 1924-1929.
- 18 Амадуни В.Г., Захарян А.К. // Сов. мед. — 1989. — № 12. — С. 3-5.
- 19 Амадуни В.Г., Егоян А.К., Нариманов М.З., Зильфян А.В. // Тер. архив. — 1983. — №3. — С.34-37.
- 20 Амадуни В.Г., Захарян А.К. // Вопросы мед. химии. — 1991. — № 2. — С.63-66.

COUPLING OF CALCIUM HOMEOSTASIS AND LIPID PEROXIDATION IN MECHANISMS OF BRONCHI HYPERREACTIVITY IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

V.G.Amatuni, K.L.Malayan

Medical Institute, Erevan

A comparative study of calcium homeostasis, calcium regulating system and lipid peroxidation has been done with 16 bronchial asthma patients (BA) at bronchospasm of physical effort (BPhE) and with 15 asthma attack patients in remission period.

The data obtained point to the close pathogenetic link between the changes of calcium homeostasis, hormonal calcium regulating system and LPO strengthening the appearance of hyperreactivity of bronchial tree and BA.

Key words: bronchial asthma, Ca^{2+} , lipid peroxidation, hyperreactivity.