

© Коллектив авторов, 2003

А. И. Рывкин, Е. Н. Андрианова, Т. Г. Решетова, Н. С. Побединская

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ГЕНЕЗЕ РЕСПИРАТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ У ДЕТЕЙ

Государственная медицинская академия, г. Иваново, РФ

У 248 больных бронхиальной астмой (БА) различной степени тяжести проведено исследование уровня продуктов окисления оксида азота (NO) — нитрит-анионов — и циркулирующих эндотелиоцитов во взаимосвязи с параметрами функции внешнего дыхания в различные периоды заболевания. Показано, что максимальные отклонения изучаемых параметров зарегистрированы при обострении тяжелой БА. Причем повышенный уровень NO и циркулирующих эндотелиоцитов сохранялся в ремиссию заболевания, что связано, по-видимому, с персистенцией патологического процесса в дыхательной системе. С другой стороны, гиперпродукция NO и эндотелиальная дисфункция, участвуя в реализации респираторных нарушений, поддерживали хроническое аллергическое воспаление бронхиального дерева.

The level of nitrogen oxide (NO) oxidation products — nitrit — anions — and number of circulated endotheliocytes were studied in 248 patients with bronchial asthma (BA) of various severity in correlation with lung ventilation parameters in different stage of disease. Maximal deviation of studied parameters was registered in cases of severe BA relapse. High level of NO and circulated endotheliocytes persisted during BA remission, and it was probably due to persistence of pathologic process in respiratory tract. On the other side, NO hyperproduction and endothelial dysfunction, playing role in respiratory disorders realization assisted to persistence of bronchial chronic allergic inflammation.

Важная роль в реализации многих патофизиологических эффектов при бронхиальной астме (БА) принадлежит оксиду азота (NO), который является биологическим маркером активности воспалительного процесса [1, 3]. При этом воспалительная реакция, как правило, не ограничивается слизистой оболочкой респираторного тракта. В развитии патологического процесса активное участие принимает система микрогемодиализации. В связи с этим нами предпринято исследование уровня продуктов окисления NO — нитрит-анионов, а также циркулирующих эндотелиоцитов во взаимосвязи с параметрами функции внешнего дыхания (ФВД) в зависимости от степени тяжести заболевания в различные периоды БА.

Материалы и методы исследования

Для исследования, в соответствии с критериями заболевания, рекомендованными Национальной программой «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (1997), отобрано 248 больных в возрасте от 6 до 14 лет, находившихся на лечении в детском пульмонологическом отделении областной клинической больницы г. Иваново. Распределение больных atopической БА в зависимости от степени тяжести, давности заболевания, возраста и пола представлено в табл. 1.

ФВД с оценкой показателей кривой «поток—объем» изучали по данным динамической спирографии на аппарате SPIROSIFT 3000 (Япония).

Для определения содержания стабильного продукта окисления NO — нитрит-аниона (NO_2^-) — в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ), цельной крови и эритроцитах после предварительного осаждения белков сульфатом цинка использовали реактив Griess, содержащий равные объемы 0,1% N-(1-нафтил)—этилендиамин гидрохлорида, 1% сульфаниламида и 5% фосфорной кислоты. Реактив способствует превращению NO_2^- в сиреневое азосоединение, интенсивность окраски которого (пропорциональную концентрации NO_2^-) измеряли на спектрофотометре при длине волны 540 нм [2, 7].

В качестве маркера дисфункции эндотелия использовали количество десквамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток в крови. Подсчет эндотелиоцитов проводили методом фазово-контрастной микроскопии [5].

Статистическую обработку полученных данных проводили общепринятыми методами альтернативно-вариационной статистики с использованием прикладных программ Excel-97, «Статистика» [6]. Математическое обеспечение работы включало расчет средней арифметической (M) и ее стандартной ошибки (m). Достоверность различий, полученных в сравниваемых группах, оценивали по t-критерию. Для выяснения степени взаимосвязи между изучаемыми показателями были рассчитаны коэффициенты парной корреляции (r).

Результаты и их обсуждение

Обострение БА, наряду с зависимыми от степени тяжести изменениями ФВД (табл. 2), характеризовалось увеличением концентрации NO_2^- в различных биологических средах — в КВВ (NO_2^- квв = $0,070 \pm$

Таблица 1

Распределение больных атопической бронхиальной астмой в зависимости от степени тяжести, давности заболевания, возраста и пола

Тяжесть заболевания	Давность заболевания, годы						Возраст, годы				Пол				Всего	
	1—2		3—4		5 и более		6—10		11—14		мальчики		девочки			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Легкая	23	9,3	9	3,6	17	6,9	21	8,5	28	11,3	36	14,5	13	5,3	49	19,8
Средняя	18	7,2	31	12,5	60	24,2	51	20,6	58	23,4	70	28,2	39	15,7	109	43,9
Тяжелая	—	—	25	10,1	65	26,2	49	19,7	41	16,5	55	22,2	35	14,1	90	36,3
Итого	41	16,5	65	26,2	142	57,3	121	48,8	127	51,2	161	64,9	87	35,1	248	100

Таблица 2

Показатели ФВД в различные периоды в зависимости от степени тяжести БА

Параметры	Контрольная группа (n=26)	Степень тяжести БА		
		легкая (n=39)	среднетяжелая (n=107)	тяжелая (n=90)
		Обострение		
ЖЕЛ, %	99,5 ± 2,1	80,1 ± 2,4	75,4 ± 2,3*	75,6 ± 2,3*
ФЖЕЛ, %	89,3 ± 2,4	83,5 ± 2,8*	62,6 ± 3,1*	60,4 ± 2,3*
ОФВ ₁ , %	95,6 ± 3,1	81,2 ± 3,1*	64,6 ± 2,7*	59,8 ± 2,5*
ПСВ, %	91,2 ± 3,2	87,1 ± 3,0	79,5 ± 4,2	63,3 ± 3,4*
МОС ₂₅ , %	95,4 ± 2,8	78,8 ± 3,3	76,2 ± 4,8	68,5 ± 3,6*
МОС ₅₀ , %	92,1 ± 2,6	82,4 ± 4,2	81,5 ± 4,8	71,9 ± 3,6*
МОС ₇₅ , %	96,5 ± 4,3	78,3 ± 5,5	74,6 ± 4,2*	66,4 ± 3,5*
		Ремиссия		
ЖЕЛ, %	99,5 ± 2,1	91,0 ± 2,5	87,6 ± 3,0	80,8 ± 3,9
ФЖЕЛ, %	89,3 ± 2,4	86,5 ± 2,4	83,9 ± 3,4	65,3 ± 2,7*
ОФВ ₁ , %	95,6 ± 3,1	85,9 ± 2,6	81,8 ± 3,2	68,0 ± 4,6*
ПСВ, %	91,2 ± 3,2	97,8 ± 4,2	87,8 ± 6,5	74,3 ± 2,2
МОС ₂₅ , %	95,4 ± 2,8	96,9 ± 4,4	85,1 ± 6,0	83,1 ± 8,4
МОС ₅₀ , %	92,1 ± 2,6	90,9 ± 4,5	81,2 ± 5,8	72,3 ± 8,8
МОС ₇₅ , %	96,5 ± 4,3	88,9 ± 9,7	88,4 ± 5,5	82,0 ± 10,2

Здесь и в табл. 4: * p<0,05 при сравнении показателей у больных БА и детей контрольной группы.

± 0,003 мкмоль/л), цельной крови (NO_2^- кр = $0,054 \pm 0,001$ мкмоль/мл) и эритроцитах (NO_2^- эр = $0,233 \pm 0,001$ мкмоль/мл).

Повышение NO_2^- , вероятно, связано с активацией индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в очаге воспаления, в результате чего в бронхолегочной системе накапливался пероксинитрит, который повреждал сосудистый эндотелий, приводя к повышению количества циркулирующих эндотелиоцитов ($21,0 \pm 0,02 \cdot 10^4/\text{л}$), что можно рассматривать в качестве критерия эндотелиальной дисфункции [5].

Выраженность изменений уровня NO_2^- и десквамированных эндотелиоцитов зависели от тяжести заболевания (табл. 3, рис. 1).

Минимальные отклонения зарегистрированы при обострении легкой БА. Эндобронхиальная и внутриэритроцитарная концентрации NO_2^- не отличались от контрольных значений, однако в цельной крови содержание NO_2^- возрастало вдвое. Практически в 2 раза увеличивалось и число циркулирующих эндотелиоцитов. Острый период БА средней степени тяжести отличался более выраженными отклонени-

Таблица 3

Уровень NO₂⁻ и циркулирующих эндотелиоцитов в различные периоды в зависимости от степени тяжести заболевания

Параметры	Контрольная группа (n=21)	Степень тяжести БА		
		легкая (n=16)	среднетяжелая (n=16)	тяжелая (n=19)
		Обострение		
NO ₂ ⁻ квв, мкмоль/мл	0,050 ± 0,004	0,055 ± 0,006	0,066 ± 0,006 ¹⁾	0,086 ± 0,005 ^{1),2),3)}
NO ₂ ⁻ кр, мкмоль/мл	0,012 ± 0,002	0,021 ± 0,001 ¹⁾	0,051 ± 0,001 ^{1),2)}	0,091 ± 0,003 ^{1),2),3)}
NO ₂ ⁻ эр, мкмоль/мл	0,190 ± 0,001	0,192 ± 0,001	0,223 ± 0,003 ¹⁾	0,284 ± 0,002 ^{1),2)}
ЦЭ, • 10 ⁴ /л	5,5 ± 0,01	11,1 ± 0,01 ¹⁾	24,9 ± 0,1 ^{1),2)}	27,1 ± 0,03 ^{1),2)}
		Ремиссия		
NO ₂ ⁻ квв, мкмоль/мл	0,050 ± 0,004	0,048 ± 0,004	0,052 ± 0,007	0,072 ± 0,006 ^{1),2)}
NO ₂ ⁻ кр, мкмоль/мл	0,012 ± 0,002	0,072 ± 0,002 ¹⁾	0,050 ± 0,002 ¹⁾	0,100 ± 0,006 ^{1),2),3)}
NO ₂ ⁻ эр, мкмоль/мл	0,190 ± 0,001	0,181 ± 0,004	0,131 ± 0,002 ¹⁾	0,221 ± 0,006 ^{1),2),3)}
ЦЭ, • 10 ⁴ /л	5,5 ± 0,01	9,4 ± 0,01 ¹⁾	23,2 ± 0,1 ^{1),2)}	29,9 ± 0,1 ^{1),2)}

p<0,05: ¹⁾ при сравнении показателей у больных БА и детей контрольной группы, ²⁾ при сравнении показателей у больных с легкой БА, ³⁾ при сравнении показателей у больных со среднетяжелой БА.

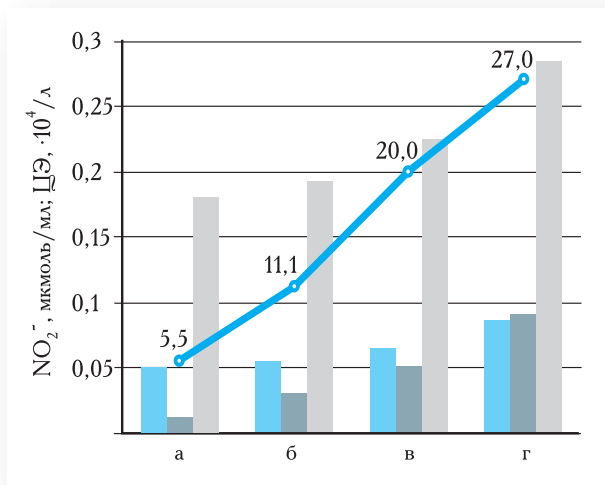


Рис. 1. Уровень нитрит-анионов и циркулирующих эндотелиоцитов у больных в периоде обострения бронхиальной астмы в зависимости от степени тяжести заболевания. Здесь и на рис. 2: а — контрольная группа, б — легкая БА, в — среднетяжелая БА, г — тяжелая БА, — ЦЭ, ■ NO квв, ■ NO кр, ■ NO эр.

ями исследуемых параметров. Возрастала продукция NO, что отражалось в повышении концентрации NO₂⁻ в КВВ, крови и эритроцитах. Значительно увеличивалось количество десквамированных эндотелиальных клеток (24,9•10⁴/л). При обострении тяжелой БА регистрировалась наибольшая концентрация продуктов окисления NO — как внутри-, так и внеклеточная.

Следует подчеркнуть, что уровень NO у больных с тяжелой БА варьировал в зависимости от вида лечения (табл. 4). У пациентов, которые длительно получали базисную противовоспалительную терапию ингаляционными глюкокортикостероидами (иГКС), концентрация NO₂⁻ была ниже, что объяснялось супрессивным действием препаратов.

Десквамация эндотелиоцитов в остром периоде тяжелой БА достигала 27,1•10⁴/л. Избыточное накопление NO в просвете бронхов и увеличение уровня токсичных радикалов вели к реакции переокисления липидов клеточных мембран, расширению и углублению воспаления дыхательных путей за счет повышения сосудистой проницаемости. Увеличенное содержание циркулирующих эндотелиальных клеток отражало, по-видимому, степень повреждения легочных сосудов в результате активации воспалительного процесса.

Четкая взаимосвязь степени эндотелиальной дисфункции с тяжестью заболевания, указывала на ее вторичный характер.

Корреляционный анализ в периоде обострения выявил взаимосвязь исследуемых параметров с показателями ФВД в зависимости от тяжести БА (табл. 5).

Прежде всего, следует отметить, что концентрация NO₂⁻ квв имела сильную корреляцию с содержанием NO⁻ в крови и эритроцитах при всех вариантах течения заболевания. Известно, что в респираторном тракте представлены три типа NO-синтаз (NOS). NO продуцируют конститутивные NOS (сNOS) эндотелия легочных сосудов, эпителиальных клеток [4], нейронов неадренергической нехолинергической нервной системы [8], а также iNOS эпителия дыхательных

Таблица 4

Концентрация NO₂⁻ при тяжелой БА в зависимости от вида терапии

Параметры	Контрольная группа (n=21)	Вид терапии	
		без иГКС (n=19)	на фоне иГКС (n=17)
NO ₂ ⁻ квв, мкмоль/л	0,050 ± 0,004	0,086 ± 0,005*	0,026 ± 0,003**
NO ₂ ⁻ кр, мкмоль/мл	0,012 ± 0,002	0,091 ± 0,003*	0,030 ± 0,010**
NO ₂ ⁻ эр, мкмоль/мл	0,190 ± 0,001	0,284 ± 0,002*	0,186 ± 0,003**

** p<0,05 при сравнении показателей у больных БА, получавших и не получавших иГКС.

Таблица 5

Корреляционные связи между показателями NOквв, циркулирующими эндотелиоцитами и ФВД в различные периоды БА в зависимости от степени тяжести заболевания

Показатели		Обострение			Ремиссия
		легкая БА	средняя БА	тяжелая БА	тяжелая БА
		NOквв			
ФВД	ФЖЕЛ	-0,71	-0,5	-0,59	-0,42
	ОФВ ₁	-0,83	-0,66	-0,9	-0,7
	ПСВ	-0,53	—	-0,54	-0,56
	МОС ₂₅	-0,32	-0,54	-0,73	-0,5
	МОС ₅₀	—	-0,42	-0,67	-0,42
	МОС ₇₅	-0,41	-0,48	-0,58	-0,4
НОкр		+0,78	-0,9	+0,71	+0,66
НОэр		+0,75	+0,55	+0,68	+0,58
ЦЭ		+0,54	+0,82	+0,91	+0,73

путей [9], воспалительных и иммунокомпетентных клеток (макрофагов, нейтрофилов, тучных клеток), эндотелия, миоцитов. Являясь высокоактивной липофильной молекулой, NO свободно проникает через клеточные мембраны, в различные биологические среды организма, в том числе эритроциты и кровь, что также является признаком активности воспалительного процесса.

При легкой БА отмечались сильные и умеренно выраженные связи обратной направленности содержания NO₂⁻ квв с объемными (ФЖЕЛ, ОФВ₁) и скоростными (ПСВ) показателями легочной вентиляции, что подтверждало наличие активного воспаления в бронхиальном дереве, приводящего к ограничению воздухопроводимости на уровне центральных

дыхательных путей. Слабая связь с МОС₇₅, которая является признаком нарушения бронхиальной проходимости периферических отделов респираторного тракта, свидетельствовала о вовлечении их в патологический процесс. Кроме того, в периоде обострения заболевания определялась умеренная корреляция между содержанием NOквв и количеством циркулирующих эндотелиоцитов. Это позволяет сделать вывод о том, что воспалительный процесс, распространяясь на легочные сосуды, вызывал десквамацию клеток внутреннего слоя, приводя к развитию вторичной эндотелиальной дисфункции.

В остром периоде среднетяжелой БА по-прежнему регистрировалась взаимосвязь уровня NOквв с выраженностью бронхиальной обструкции, которая носи-

ла генерализованный характер, вовлекая в патологический процесс весь респираторный тракт. Увеличивалось влияние воспаления на степень эндотелиальной дисфункции ($r = +0,82$).

При обострении тяжелой БА сохранялся характер негативного воздействия маркера воспаления на уровень бронхиальной проходимости. При этом возрастала степень влияния NO на выраженность обструкции центральных (ОФВ₁ — $r = -0,9$; МОС₂₅ — $r = -0,73$), средних (МОС₅₀ — $r = -0,67$) и дистальных (МОС₇₅ — $r = -0,58$) дыхательных путей, свидетельствуя о генерализованном вовлечении респираторного тракта в патологический процесс.

Избыточное накопление NO в бронхиальном дереве углубляло воспаление за счет повреждения легочных сосудов, на что указывало увеличение силы взаимосвязи медиатора с десквамацией эндотелия ($r = +0,91$).

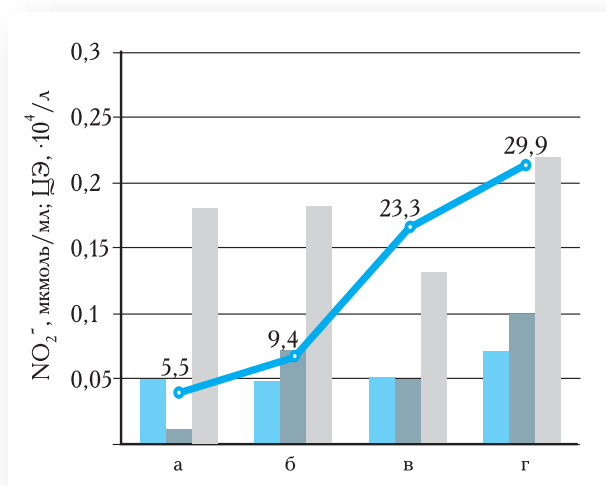


Рис. 2. Уровень нитрит-анионов и циркулирующих эндотелиоцитов у больных в периоде ремиссии бронхиальной астмы в зависимости от степени тяжести заболевания.

В периоде ремиссии БА, наряду с респираторными нарушениями (табл. 2), сохранялась повышенная внутриклеточная концентрация NO₂⁻ ($0,074 \pm \pm 0,002$ мкмоль/мл). Эндотелиальная дисфункция также носила пролонгированный характер (ЦЭ= $20,7 \pm \pm 0,05 \cdot 10^4$ /л). Степень отклонений исследуемых показателей зависела от тяжести заболевания (табл. 3, рис. 2). При легком и среднетяжелом вариантах заболевания повышенной концентрации NO₂⁻ в КВВ не выявлялось, однако содержание мессенджера в крови было высоким, вероятно, за счет продукции его клетками воспаления в бронхолегочной системе. Циркулирующих эндотелиоцитов определялось больше, чем в контроле. Тяжелая БА сопровождалась

повышенной концентрацией NO₂⁻ и самой высокой степенью десквамации эндотелия. При этом уровень NO₂⁻ квв был взаимосвязан с высокими концентрациями мессенджера в крови и эритроцитах (табл.5). Определялись отрицательные корреляции NO₂⁻ квв с показателями бронхиальной проходимости, которая оставалась низкой. Наиболее выраженной была взаимосвязь маркера воспаления и ОФВ₁ ($r = -0,7$). Сохранялась зависимость количества десквамированных эндотелиоцитов от уровня медиатора ($r = +0,73$), что подчеркивало воспалительный генез эндотелиальной дисфункции.

Заключение

Таким образом, развитие БА характеризовалось зависимыми от тяжести заболевания изменениями уровня NO и циркулирующих эндотелиоцитов. Максимально выраженные отклонения, проявляющиеся значительным повышением продукции NO и эндотелиальной дисфункцией, зарегистрированы при обострении тяжелой БА. В периоде ремиссии БА сохранялся высокий уровень NO и циркулирующих эндотелиоцитов. По-видимому, указанные изменения являлись следствием персистенции патологического процесса в дыхательной системе. Избыточное накопление NO в слизистой оболочке бронхов углубляло воспаление за счет повреждения легочных сосудов. С другой стороны, гиперпродукция NO и эндотелиальная дисфункция, участвуя в реализации респираторных нарушений, поддерживали хроническое аллергическое воспаление бронхиального дерева.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика: Национальная программа. — М., 1997. — 93 с.
2. Лабораторные исследования в ветеринарии: химико-токсикологические методы. Справочник. / Под ред. Б. И. Антонова. — М., 1989. — 320 с.
3. Лев Н. С. // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. — 2000. — № 4. — С. 48—51.
4. Невзорова В. А., Елисеева М. В., Зуца М. В. и др. // Тер. архив. — 1998. — № 3. — С. 13—18.
5. Петрищев Н. Н., Беркович О. А., Власов Т. Д. и др. // Клини. лаб. диагностика. — 2001. — № 1. — С. 50—52.
6. Сергиенко В. И., Бондарева И. Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. — М., 2001. — 256 с.
7. Фланаган Р. Дж., Брейтуэйт Р. А., Браун С. и др. Основы аналитической токсикологии. — ВОЗ, Женева, 1997. — 7 с.
8. Adnot S., Raffestin B., Eddahibi S. // Respir. Physiol. — 1995. — Vol. 101, № 2. — P. 109—120.
9. Guo F. H., De-Raeve H. R. Rice T. W. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1995. — Vol. 92, № 17. — P. 7809—7813.