

© Коллектив авторов, 2003

*А. А. Ляпунов**, *И. И. Балаболкин**, *В. С. Реутова**, *И. К. Волков**,
*А. Л. Черняев***, *М. В. Самсонова***, *А. В. Черняк***,
*Т. П. Дмитрова***, *Н. А. Вознесенский***

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

* НИИ педиатрии, ГУ Научный Центр здоровья детей РАМН; ** Институт пульмонологии МЗ РФ, Москва

Целью работы явилось определение мониторинга уровня оксида азота в выдыхаемом воздухе (NOexh) как показателя аллергического воспаления бронхов у детей с бронхиальной астмой (БА). Обследовано 65 детей с БА в возрасте от 6 до 17 лет. Проводили провокационные тесты с гистамином, метахолином, определение NOexh хемилюминесцентным методом, изучение клеточного состава бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ) и индуцированной мокроты, бронхоскопию и биопсию бронха. Распределение признака NOexh не являлось нормальным. Отмечалась тенденция к повышению уровня NOexh с возрастанием тяжести течения БА, достоверное повышение NOexh в периоде обострения БА по сравнению с ремиссией (медиана; 25-й и 75-й перцентиль): 16,1; 12; 22,7 ppb и 9; 6; 14 ppb соответственно. Достоверной корреляции NOexh с ПД20 (тест с гистамином) и ПК20 (тест с метахолином) обнаружено не было. Выявлена достоверная прямая корреляция NOexh с толщиной базальной мембраны бронхов ($r_s=0,73$; $p=0,02$), выраженностью лимфогистиоцитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки ($r_s=0,65$; $p<0,01$) и количеством эозинофилов (в %) в индуцированной мокроте и БАЛЖ ($r_s=0,46$; $p<0,04$). Уровень NOexh может использоваться для оценки степени выраженности аллергического воспаления бронхов у детей с БА.

The aim of the study was to evaluate whether exhaled nitric oxide (NOexh) level reflects the severity of airway allergic inflammation in asthmatic children. 65 asthmatics aged from 7 to 16 years were enrolled in study. The next tests were performed: bronchial challenge tests with histamine and methacholine, determination of exhaled nitric oxide by chemiluminescence method, study of bronchial alveolar lavage fluid (BALF) and induced sputum cytology, biopsy of bronchus. The distribution of feature «Noexh» was not normal and was described by non-parametric methods. There was a tendency for correlating of NOexh level and asthma severity, significant increase NOexh in acute asthma period in comparison with remission (median, 25; 75 percentile): 16,1; 12; 22,7 ppb and 9; 6; 14 ppb respectively. There was not correlation of NOexh and degree of airway hyperresponsiveness (PD20 histamine; PK20 methacholine). We revealed positive correlation with NOexh and thickness of basal membrane of lamina propria ($r_s=0,73$, $p<0,05$), degree of lymphoid infiltration of lamina propria ($r_s=0,65$, $p<0,01$), amount of eosinophils (%) in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid ($r_s=0,46$, $p<0,04$). So; NOexh level may be used in evaluation of airway allergic inflammation intensity in asthmatic children.

Своевременная оценка степени аллергического воспаления дыхательных путей при бронхиальной астме (БА) позволяет подбирать и корректировать соответствующую противовоспалительную терапию. Среди известных в настоящее время неинвазивных косвенных методов оценки можно назвать определение бронхиальной гиперреактивности (БГР) (в тесте с гистамином или метахолином), уровня эозинофилов в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ) и индуцированной мокроте (ИМ). За последние несколько лет активно обсуждается возможность применения мониторинга оксида азота (NO) в выдыхаемом воздухе (NOexh) для суждения о выраженности аллергического воспаления дыхательных путей при БА [4].

NO образуется из L-аргинина [17] под действием различных NO-синтаз (индуцибельной, конституци-

ональной) эндотелиальными клетками и эпителием верхних дыхательных путей. Уровень NO в выдыхаемом воздухе отражает концентрацию NO, образующегося клетками воздухоносных путей и альвеол [7]. Уровень NOexh у больных БА достоверно выше, чем у здоровых [1, 2] и снижается при терапии ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГК) [3, 5]. Это происходит за счет снижения ими экспрессии м-РНК NO-синтазы 2-го типа (индуцибельной) [11], причем имеется корреляция динамики NOexh и ОФВ₂ на фоне лечения, что может косвенно свидетельствовать о прямой связи между уровнем NOexh и степенью выраженности аллергического воспаления [19]. Уровень NOexh повышается в период поздней аллергической реакции после ингаляции аллергена (в среднем через 9 ч) [14]. Экспериментами показано, что в результате экспозиции к аллергену усиливается не только воспаление дыхательных путей, опосредуе-

мое эозинофилами и лимфоцитами, но и происходит изменение активности NO-синтаз эпителиальных клеток бронхов — повышение экспрессии индуцибельной и снижение конституциональной NO-синтазы [16]. На фоне 2-недельной элиминации аллергенов NOexh достоверно быстро снижался и вновь повышался после реэкспозиции к аллергенам клещей домашней пыли [15]. Подавление синтеза эндогенного NO приводит к усилению предшествующей гиперреактивности бронхов на гистамин у больных БА [22], хотя в то же время ингаляции NO не вызывают явного улучшения их состояния [6]. NOexh не увеличен у здоровых лиц, имеющих БГР (тест с гистамином) [21].

Уровень NOexh у больных БА, не получающих ИГК, коррелирует с тяжестью заболевания, динамикой симптомов и количеством эозинофилов в ИМ, однако при приеме ИГК такой корреляции не наблюдается [24].

Существует мнение, что калибр бронхов влияет на уровень NOexh, что нужно учитывать при интерпретации результатов [9]. У части детей NOexh повышается после ингаляции сальбутамола, что может быть связано с купированием бронхообструкции и связанной с ней задержки NO в мелких бронхах [12]. Мнение о наличии корреляции между NOexh и различными показателями, характеризующими БА, неоднозначно: одни исследователи полагают, что существует обратная корреляция между NOexh, ПД20 (в тесте с метахолином), ОФВ₁ (%), прямая — с уровнем эозинофильного катионного протеина (ЭКП) [1] и количеством эозинофилов в ИМ и БАЛЖ у детей с легким интермиттирующим течением заболевания, не получающих ИГК [13]; другие авторы корреляции между NOexh и БГР на метахолин (по ПД20) [1, 20], NOexh и ОФВ₁ (в % от должного), содержанием эозинофилов и ЭКП в крови не находят [10, 23]. Уровень NOexh прямо коррелирует с напряжением кислорода в крови [18] посредством влияния молекулярного кислорода на активность NO-синтазы 2-го типа [8]. Уровень NO при БА не коррелирует с длительностью заболевания, но он тем более высокий, чем меньше времени прошло от последнего обострения БА [1].

Несмотря на большой объем исследований по NO, сведения о возможности и перспективах его измерения у детей с БА достаточно ограничены.

Целью работы являлось определение возможности использования мониторинга NO в выдыхаемом воздухе (NOexh) для оценки степени выраженности воспаления дыхательных путей при БА.

Материалы и методы исследования

Нами обследовано 65 детей и подростков с БА в возрасте от 6 до 17 лет. Легкое интермиттирующее течение заболевания имели 10, легкое персистирующее — 32, среднетяжелое — 15 и тяжелое — 8 пациентов. 22 ребенка находились в постприступном (до 10 дней от последнего приступа удушья) периоде, 43 — в периоде

клинической ремиссии БА. В зависимости от времени, прошедшего после последнего приступа удушья, все пациенты были разделены на 3 группы: 1-я группа (22 ребенка) — до 10 дней, 2-я группа (23 ребенка) — от 10 до 30 дней, 3-я группа (20 детей) — более 30 дней.

Проводили следующие обследования:

1) определение БГР в тесте с метахолином методом непрерывного нормального дыхания по стандартному протоколу (Пульмонология, приложение «Стандартизация тестов исследования легочной функции», 1993, с. 66—68). Для ингаляций использовали провахолин (метахолина хлорид, Methapharm Inc., Канада);

2) определение БГР в тесте с гистамином;

3) исследование уровня NO в выдыхаемом воздухе хемилюминесцентным методом (измеряли в единицах «часть на миллион» — ppb);

4) изучение клеточного состава ИМ и БАЛЖ. Индукцию мокроты проводили ингаляциями гипертонического (3—5%) раствора натрия хлорида. БАЛЖ забирали из среднедолевого бронха в общем количестве 40 мл. Из клеточного осадка приготавливали стандартные монослойные цитопрепараты с использованием цитоцентрифуги Cytospin 3 (Shandon, UK). Полученные мазки окрашивали по Граму и по Романовскому-Гимза. Проводили подсчет цитогаммы и цитобактериоскопическое исследование;

5) бронхоскопия с биопсией.

Бронхиоптаты получали при фибробронхоскопии из шпоры сегментарного бронха средней доли правого легкого. Полученный материал фиксировали в 10% растворе формалина. Гистологическую обработку материала проводили по стандартной методике, полученные гистологические срезы толщиной 4—5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, проводили ШИК-реакцию. При гистологической оценке бронхиоптатов проводили также морфометрическое исследование с определением толщины базальной мембраны (с использованием объективного микрометра), а также подсчетом соотношения реснитчатых и бокаловидных клеток (при подсчете 100 клеток бронхиального эпителия).

Тест с гистамином проводили у 35 (51 измерение), с метахолином — у 16 (20 измерений) детей. Уровень NOexh оценивали до и после (через 10 мин) проведения провокационного теста с метахолином у 13 детей. Бронхоскопия с получением БАЛЖ проведена у 10 пациентов вне обострения БА, исследование ИМ — у 15 детей. Интервал между исследованиями составлял 2—3 дня, уровень NOexh определяли в день проведения провокационных тестов и получения ИМ.

Выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки бронха измеряли в баллах: 1 — отсутствует, 2 — слабая инфильтрация, 3 — умеренная, 4 — выраженная.

Критерием включения в исследование являлось отсутствие любой респираторной инфекции и противовоспалительной терапии в течение предшествующего месяца (препараты кромонового ряда при легком и среднетяжелом течении, ИГК при тяжелом течении, у большинства пациентов тяжелая БА верифицировалась впервые). Допускали прием бронхоспазмолитиков в случаях возникновения симптомов астмы.

Таблица 1

Уровень NO_{exh} при различной степени тяжести БА

Показатели	NO _{exh} , ppb			
	Тяжесть БА			
	интермиттирующая (1)	легкая персистирующая (2)	среднетяжелая (3)	тяжелая (4)
Медиана	11	13,1	15,3	7
25-й перцентиль	6	7,9	9	5,4
75-й перцентиль	14	16,5	25	12
p	(1—3): 0,09	(2—4): 0,046	(2—3): 0,068	

Результаты и их обсуждение

Распределение признака NO в выдыхаемом воздухе в зависимости от частоты наблюдений не являлось нормальным, поэтому статистическую обработку проводили непараметрическими методами с использованием медианы, 25-го и 75-го перцентиля, теста Вилкоксона, коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Распределение детей по концентрации NO в выдыхаемом воздухе выглядело следующим образом: у 36% пациентов — от 10 до 15 ppb, у 17% — от 15 до 20 ppb, из 15% — от 5 до 10 ppb и у 15% — от 25 до 30 ppb. Около 5% детей имели высокие — от 35 до 40 ppb — и низкие — до 5 ppb — уровни NO_{exh}. Таким образом, более чем у 1/3 детей с БА отмечались уровни NO_{exh} от 10 до 15 ppb.

Как показала оценка уровня NO_{exh} в зависимости от тяжести течения БА, имелась тенденция к повышению NO_{exh} с утяжелением заболевания, что выявлялось при сравнении БА интермиттирующего, легкого персистирующего и среднетяжелого течения. Тяжелая БА характеризовалась невысоким уровнем NO_{exh}, сходным с таковым при интермиттирующей БА, и достоверно более низким, чем при легком персистирующем течении заболевания. В момент измерения NO_{exh} все дети с тяжелой БА находились в периоде обострения и имели умеренные генерализованные нарушения бронхиальной проходимости. Значения NO_{exh} в зависимости от тяжести течения заболевания представлены в табл. 1.

При изучении динамики концентрации NO_{exh} в различные периоды БА его значения у больных 1-й и 2-й групп, а также 2-й и 3-й групп не различались, однако выявлено достоверное повышение уровня NO_{exh} при обострении заболевания и снижение — при наступлении ремиссии (1-я и 3-я группы соответственно) (табл. 2).

Повышение уровня NO_{exh} с «утяжелением» БА, а также в периоде обострения заболевания по сравнению с периодом ремиссии может свидетельствовать о наличии и интенсивности аллергического воспали-

тельного процесса в бронхах и взаимосвязи NO и воспалительного процесса дыхательных путей.

Единовременное определение степени БГР (тесты с гистамином и метахолином) и уровня NO_{exh} не выявило достоверной корреляции между этими параметрами: коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s) при сравнении NO_{exh} и ПД20 (тест с гистамином) составил $-0,22$ ($p=0,14$), а для NO_{exh} и ПК20 (тест с метахолином) — $-0,14$ ($p=0,6$). По нашим наблюдениям, высокая степень БГР имела у определенного числа детей с легкой БА в периоде ремиссии заболевания при низких значениях NO_{exh}, а также у детей с тяжелой БА при низком NO_{exh} и умеренных генерализованных нарушениях бронхиальной проходимости. Это может указывать на то, что косвенно судить о степени БГР по уровню NO_{exh} нельзя. Высокая БГР при отсутствии явных признаков аллергического воспаления бронхов и низком NO_{exh} у части детей может объясняться изначально «конституционально» высоким ее уровнем. Характер связи между степенью БГР и NO_{exh} не менялся в различные периоды БА, что подчеркивает ее постоянство.

Таблица 2

Динамика NO_{exh} в зависимости от периода БА

Показатели	NO _{exh} , ppb		
	Период БА		
	обострение (1)	постприступный (2)	ремиссия (3)
Медиана	16,1	13,3	9
25-й перцентиль	12	7	6
75-й перцентиль	22,7	20	14
p	(1—3): 0,01		

Нами определялась взаимосвязь между длительностью БА и уровнем NOexh. В генеральной совокупности (65 детей) коррелятивных связей выявлено не было: r_s составил 0,15 ($p=0,21$). Зависимости NOexh от длительности заболевания не о б н а р у ж и в а л о с ь и при анализе БА различной степени тяжести. Отсутствие повышения NOexh со временем при стабильном (по тяжести и клинике) течении заболевания может свидетельствовать о том, что выраженность аллергического воспаления бронхов сохраняется на постоянном уровне.

Провокационная проба с метахолином, приводящая к бронхоспазму, вызвала достоверное снижение NOexh у 12 из 14 обследованных детей: медиана 16,1 ppb, 25-й перцентиль 6,7 ppb, 75-й перцентиль 25,3 ppb до пробы с метахолином; медиана 12,6 ppb, 25-й перцентиль 5,9 ppb, 75-й перцентиль 21,8 ppb после пробы с метахолином ($p<0,01$, тест Вилкоксона).

Снижение уровня NOexh после провокационной пробы с метахолином может происходить вследствие развивающегося бронхоспазма, однако не исключено и предполагаемое некоторыми исследователями «вымывание» NO из бронхов вследствие выполнения теста (форсированный выдох, гипервентиляция).

Для решения вопроса о возможности использования мониторинга NOexh в качестве маркера степени выраженности аллергического воспаления бронхов проводилось изучение корреляционных связей между уровнем NOexh и такими морфологическими показателями аллергического воспаления бронхов, как толщина базальной мембраны, выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки бронхов, количество эозинофилов в ИМ и БАЛЖ.

Уровень NOexh достоверно коррелировал с толщиной базальной мембраны бронхов: $r_s=0,73$ ($p=0,02$). Эти данные согласуются с имеющимися в настоящее время мнениями относительно оценки тяжести БА по толщине базальной мембраны бронхов. Выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки бронхов (измеряемая в баллах) также прямо коррелировала с уровнем NOexh: $r_s=0,65$ ($p<0,01$). Уровень NOexh не отражал соотношение реснитчатых и базальных клеток в эпителии бронхов. Изучение уровня NOexh, клеточного состава ИМ и БАЛЖ показало отсутствие значимой корреляции между количеством эозинофилов (в процентах от общего количества клеток) и уровнем NOexh: r_s для ИМ составлял 0,42 ($p=0,15$), для БАЛЖ — 0,56 ($p=0,15$). При суммарной оценке количества эозинофилов (в ИМ и БАЛЖ) выявлена достоверная прямая корреляция с уровнем NOexh: $r_s=0,46$ ($p<0,05$). Значимых коррелятивных связей между NOexh и количеством лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов в БАЛЖ и ИМ обнаружено не было.

В результате проведенного исследования нами обнаружена зависимость NOexh от тяжести и периода БА, прямая коррелятивная связь между уровнем NOexh и

такими показателями степени аллергического воспаления бронхов, как толщина базальной мембраны, выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки бронхов, количество эозинофилов в ИМ и БАЛЖ.

Выводы

1. Уровень NO в выдыхаемом воздухе является маркером аллергического воспаления бронхов при БА.

2. Определение NOexh целесообразно при оценке тяжести и периода БА, а также для своевременной коррекции противовоспалительной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вознесенский Н. А. Выдыхаемый оксид азота — биомаркер бронхиальной астмы: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — М., 2000. — 26 с.
2. Вознесенский Н. А., Чучалин А. Г., Антонов Н. С. // Пульмонология. — 1998. — № 2. — С. 6—10.
3. Byrnes C., Dinaveric S., Shinebourne E. et al. // *Pediatr. Pulmonol.* — 1997. — Vol. 131, № 5. — P. 312—318.
4. Chedevergne F., Le Bourgeois M., de Blic J. et al. // *Arch. Dis. Child.* — 2000. — Vol. 82. — Suppl. 2. — P. 116—119.
5. Colon-Semidey A., Marshik P., Crowley M. et al. // *Pediatr. Pulmonol.* — 2000. — Vol. 30, № 5. — P. 385—392.
6. Dinh-Xuan A., Barouxis C., Van Ngujen T. et al. // *Rev. fr. allergol. et immunol. clin.* — 1998. — Vol. 38, № 3. — P. 165—174.
7. Dirnberger E., Lucan H., Eichler H. et al. // *Life Sci.* — 1998. — Vol. 157, № 2. — P. 103—108.
8. Dweik R., Laskowski D., Abu-Soud H. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 78, № 4. — P. 660—666.
9. Gouw H., Hendrics J., Woltman A. et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 131, № 1. — P. 315—319.
10. Gratziou C., Rovina N., Lignos M. et al. // *Eur. Respir. Soc. Congr.* — Madrid, 1999. — P. 1202.
11. Guo F., Comhair S., Zheng S. et al. // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164, № 11. — P. 5970—5980.
12. Huls G., Focke C., Lindemann H. // *Eur. Respir. Soc. Congr.* — Madrid, 1999. — P. 320.
13. Jatakanon A., Lim S., Kharitonov S. et al. // *Thorax.* — 1998. — Vol. 53, № 2. — P. 91—95.
14. Pardi P., Leckie M., Horvath I. et al. // *Eur. Respir. J.* — 1999. — Vol. 13, № 1. — P. 48—52.
15. Piacentini G., Peroni D., Bodini A. et al. // *Eur. Respir. Soc. Congr.* — Madrid, 1999. — P. 315.
16. Ricciardolo F., de Gouw H., van Schadewijk A. et al. // *Eur. Respir. Soc. Congr.* — Madrid, 1999. — P. 1200.
17. Sapienza M., Kharitonov S., Horvath I. et al. // *Thorax* — 1998. — Vol. 53, № 3. — P. 172—175.
18. Schmetterer L., Strenn K., Kastner J. // *Thorax.* — 1997. — Vol. 53, № 6. — P. 736—738.
19. Silvestri M., Battistini E., Fregonese B. et al. // *Eur. Respir. Soc. Congr.* — Madrid, 1999. — P. 108.
20. Silvestri M., Spallarosa D., Battistini E. et al. // *Thorax.* — 2000. — Vol. 55, № 6. — P. 484—488.
21. Sundblad B., Ericsson I., Gustafsson L. et al. // *Eur. Respir. Soc. Congr.* — Madrid, 1999. — P. 1206.
22. Taylor D., McGrath J., Orr L. et al. // *Thorax.* — 1998. — Vol. 53, № 6. — P. 483—489.
23. Tognella S., Micheletto C., Pomari C. et al. // *Eur. Respir. Soc. Congr.* — Madrid, 1999. — P. 1188.
24. Tsujino I., Nishimura M., Kamachi A. et al. // *Respiration.* — 2000. — Vol. 67, № 6. — P. 645—651.