

## Особенности содержания эндотелина-1 и эндобронхиальной концентрации метаболитов оксида азота при хронической обструктивной болезни легких

1 – ФГОУ ВПО "Институт ФСБ России": 603163, Нижний Новгород, Казанское ш., 2;

2 – МЛПУ "Детская городская клиническая больница № 27 "Айболит": 603035, Нижний Новгород, ул. Ярошенко, 7а;

3 – МЛПУ "Городская больница № 28": 603035, Нижний Новгород, ул. Чаадаева, 7;

4 – ФГУ "НИИ пульмонологии ФМБА России": 105077, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, к. 4

*L.B.Postnikova, N.I.Kubysheva, R.Z.Mindubaev, M.V.Boldina, S.K.Soodaeva*

## Concentrations of serum endothelin-1 and endobronchial nitric oxide metabolites in chronic obstructive pulmonary disease

### Summary

The aim of the study was to assess circulating level of endothelin-1 (ET-1) and exhaled breath condensate (EBC) concentration of NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> in COPD stage II or III patients. We investigated 67 patients with COPD. ET-1 level in blood and NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> concentration in EBC were significantly increased in acute exacerbation of COPD. In stable COPD, concentration of NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> in EBC decreased compared with that in exacerbation. Thus, measurement of NO metabolites in EBC could be recommended for monitoring the inflammation. Serum level of ET-1 after treatment was significantly higher compared to that of healthy non-smokers and of patients with acute exacerbation of COPD.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease, acute exacerbation, endothelin-1, exhaled breath condensate, nitric oxide metabolites.

### Резюме

Цель исследования – изучить особенности содержания эндотелина-1 (ЭТ-1) в крови и суммарной концентрации нитратов / нитритов (NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub>) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) у пациентов с обострением хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) II и III стадии. Обследованы 67 больных с обострением ХОБЛ. Показано, что обострение ХОБЛ у пациентов с объемом форсированного выдоха за 1-ю с < 70 % сопряжено с достоверным повышением содержания ЭТ-1 и суммарной концентрации метаболитов оксида азота в КВВ. Снижение уровня NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> в КВВ до показателей условной нормы у всех пациентов с ХОБЛ на фоне терапии позволяет рекомендовать определение концентрации данных молекул для мониторингирования активности воспаления. Сохранение избыточной концентрации ЭТ-1 в крови в период клинической стабилизации у больных ХОБЛ может служить основанием для поиска новых лекарственных препаратов, обладающих противовоспалительной активностью.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, обострение, эндотелин-1, метаболиты оксида азота, конденсат выдыхаемого воздуха.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) относится к наиболее часто встречающимся. Среди особенностей ХОБЛ выделяют рост распространенности, неуклонное прогрессирование хронического воспаления, увеличение частоты тяжелых форм и развитие системных проявлений, повышение уровня инвалидизации трудоспособного населения и смертности во всем мире [1]. Для решения этих проблем необходим поиск новых маркеров топического и системного воспаления, что позволит с большей точностью определять группы риска, предикторы обострений и осложнений, разрабатывать и внедрять в клиническую практику эффективные лекарственные препараты.

Прогрессирование хронического воспаления при ХОБЛ сопровождается избыточным образованием и нарастанием активности провоспалительных маркеров (нейтрофилов, Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup>, фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкина-6 и -8, активных форм кислорода, протеаз и др.) [2]. Среди обширного спектра молекул, влияющих на развитие ХОБЛ, следует выделить вазоактивные медиаторы – эндо-

телин-1 (ЭТ-1) и оксид азота (NO). Полипептид ЭТ-1 способствует сужению сосудов и бронхов путем связывания с эндотелиновыми рецепторами (ЭТА и ЭТВ) гладкомышечных клеток [3]. Кроме констрикции, ЭТ-1 вызывает пролиферацию фибробластов сосудистой стенки и бронхов, повышает митогенную активность гладкомышечных клеток и моноцитов, что свидетельствует о действии его как ростового фактора [4]. Воздействие ЭТ-1 ограничивается биологическими объектами, расположенными рядом с эндотелиальными клетками. Вместе с тем ЭТ-1 содержится в плазме крови здоровых лиц, а его уровень в циркуляции повышается при заболеваниях, связанных с курением и дисфункцией эндотелия [5, 6].

Оксид азота (NO) синтезируется различными клетками (эндотелиоцитами, эпителиоцитами, нейтрофилами, макрофагами, фибробластами) и контролирует в организме многие функции и биохимические процессы. При воспалении образование NO, связанное с активацией индуцибельной NO-синтазы, увеличивается в сотни раз и оказывает повреждающее дейст-

вие (ингибирование ферментов, нарушение структуры ДНК, индукция процессов перекисного окисления липидов и нитрозольного стресса, снижение антиоксидантного потенциала). Вследствие быстрого перехода в нитраты ( $\text{NO}_2$ ) и нитриты ( $\text{NO}_3$ ) NO имеет короткий период полужизни (5–30 с), что объясняет трудности его выявления в биологических средах [7]. Поэтому в клинической практике метаболизм NO чаще оценивают по суммарной концентрации конечных продуктов метаболизма NO ( $\text{NO}_2$  /  $\text{NO}_3$ ).

С целью уточнения диагностической значимости ЭТ-1 и NO при ХОБЛ были изучены содержание ЭТ-1 в крови и суммарная концентрация стабильных метаболитов NO в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) у больных с обострением ХОБЛ до и после лечения.

## Материалы и методы

В исследовании участвовали больные с обострением ХОБЛ II и III стадии, отвечающие следующим критериям включения: возраст > 40 лет, фактор риска — курение, стаж курения > 10 пачек / лет, госпитализация по поводу обострения ХОБЛ, объем форсированного выдоха за 1-ю с ( $\text{ОФВ}_1$ ) < 70 %, отношение  $\text{ОФВ}_1$  к форсированной жизненной емкости легких ( $\text{ОФВ}_1$  /  $\text{ФЖЕЛ}$ ) < 70 %. Критерии исключения были следующими: клиническая картина бронхиальной астмы в анамнезе, пневмония, застойная сердечная недостаточность, тяжелая артериальная гипертония, сахарный диабет.

Диагноз обострения ХОБЛ устанавливали в соответствии с рекомендациями по диагностике, лечению и профилактике ХОБЛ (GOLD, 2007). Группу сравнения составили здоровые некурящие лица. Исследование функции внешнего дыхания (ФВД) проводили на компьютерном спирографе *SpiroLab III* (MIR, Италия) путем анализа кривой поток—объем и оценки  $\text{ОФВ}_1$ ,  $\text{ОФВ}_1$  /  $\text{ФЖЕЛ}$  и емкости вдоха ( $E_{\text{вд}}$ ).

Содержание ЭТ-1 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью набора реагентов (*Biomedica Gruppe*, Австрия) по методике, описанной производителем.

Сбор КВВ проводили утром натощак после полоскания ротовой полости с помощью системы

*R-tube* (США), исключающей попадание слюны в исследуемый биологический субстрат. Суммарную концентрацию  $\text{NO}_2$  /  $\text{NO}_3$  в КВВ определяли спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса и кадмиевого восстановителя [8].

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы *Microsoft Excel 2003*. Рассчитывали среднее значение и среднеквадратичное отклонение, достоверность различий сравниваемых показателей (t-критерий Стьюдента).

## Результаты

В таблице представлены исходные демографические, антропометрические и функциональные показатели обследованных. В 1-ю группу вошли больные с обострением ХОБЛ II стадии, во 2-ю — пациенты с обострением ХОБЛ III стадии. В большинстве случаев участниками исследования были мужчины старше 60 лет с длительным стажем курения (> 35 пачек / лет). На момент включения в исследование у пациентов 1-й группы выявлялись умеренные нарушения бронхиальной проходимости ( $\text{ОФВ}_1$  —  $62,8 \pm 4,6$  %), во 2-й группе регистрировалась выраженная бронхиальная обструкция ( $\text{ОФВ}_1$  —  $40,5 \pm 3,9$  %).

Все пациенты получали стандартную терапию обострения ХОБЛ: небулайзерные ингаляции раствора ипратропия бромид / фенотерола в дозе 1,0 мл дважды в сутки в течение 10 дней, ингаляции ипратропия бромид / фенотерола посредством дозированного аэрозольного ингалятора в дозе 100 мкг по 2 вдоха вечером, цефтриаксон — 1,0 г 1 раз в сутки внутривенно в течение 8–10 дней, амброксол — 30 мг 2 раза в сутки.

При тяжелом течении ХОБЛ дополнительно применяли системные глюкокортикостероиды (дексаметазон в дозе 12 мг в сутки внутривенно в течение 10–12 дней) с последующим переводом на ингаляционные глюкокортикостероиды (1 000 мкг в сутки по беклометазону).

## Динамика содержания ЭТ-1

Результаты сравнительной оценки содержания ЭТ-1 в крови у больных с обострением ХОБЛ II и III стадии в динамике представлены на рис. 1.

Таблица  
Антропометрические и функциональные показатели больных с обострением ХОБЛ и здоровых некурящих лиц ( $M \pm m$ )

Параметры	1-я группа	2-я группа	Здоровые
<i>n</i>	32	35	20
Возраст, лет	$56,1 \pm 4,6$	$63,2 \pm 4,3$	$37,1 \pm 3,8$
Пол (м / ж), <i>n</i>	29 / 3	36 / 0	16 / 4
Курильщики, <i>n</i>	31		0
Индекс курения, пачек / лет	$37,5 \pm 5,8$	$39,2 \pm 4,2$	0
Бывшие курильщики, <i>n</i>	4	3	0
$\text{ОФВ}_1$ , л / %	$1,82 \pm 0,39^{**} / 62,8 \pm 4,6^*$	$1,25 \pm 0,22^{**} / 40,5 \pm 3,9^{**}$	$3,1 \pm 0,12 / 105,6 \pm 3,9$
$\text{ОФВ}_1$ / $\text{ФЖЕЛ}$	$61,6 \pm 4,4^*$	$49,1 \pm 7,9^*$	$108,1 \pm 3,7$
$E_{\text{вд}}$ , %	$68,56 \pm 7,87^*$	$63,11 \pm 7,54^*$	$110,1 \pm 2,52$

Примечание: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , различия достоверны относительно здоровых некурящих лиц.

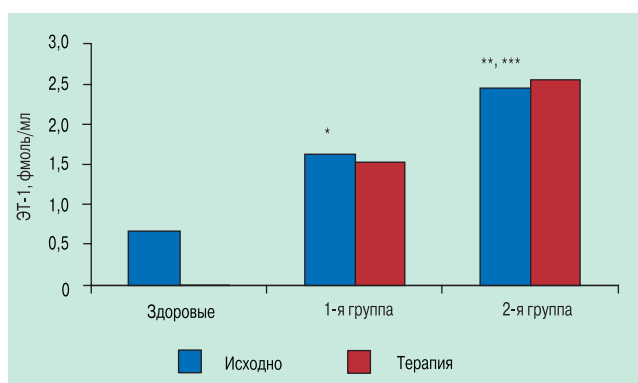


Рис. 1. Динамика содержания ЭТ-1 в крови больных с обострением ХОБЛ до и после лечения

Примечание: 1-я группа – пациенты с обострением ХОБЛ II стадии; 2-я группа – с обострением ХОБЛ III стадии; \*, \*\* – различия достоверны по сравнению с исходными параметрами (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ); \*\*\* – различия достоверны относительно 1-й группы больных ХОБЛ (\*\*\*) –  $p < 0,05$ ).

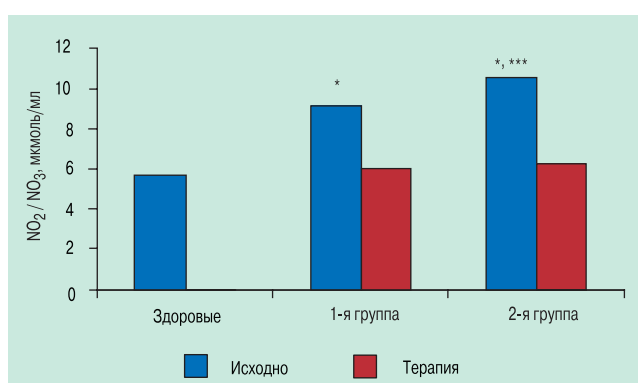


Рис. 2. Динамика суммарной концентрации NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> в КВВ у больных с обострением ХОБЛ

Примечание: группы те же, что на рис. 1; \* –  $p < 0,05$ , различия достоверны по сравнению с исходными параметрами; \*\*\* –  $p < 0,05$ , различия достоверны относительно 1-й группы больных ХОБЛ.

Исходно у всех пациентов с обострением ХОБЛ в крови достоверно нарастала концентрация ЭТ-1 по сравнению с группой здоровых некурящих лиц ( $0,67 \pm 0,07$  фмоль/мл). В частности, в 1-й группе исходный уровень ЭТ-1 в крови превышал его концентрацию у здоровых некурящих лиц в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ), а при тяжелом течении ХОБЛ – в 3,6 раза ( $p < 0,01$ ). Следует отметить, что содержание ЭТ-1 у больных 2-й группы ( $2,43 \pm 0,21$  фмоль/мл;  $p < 0,05$ ) в 1,5 раза превышало уровень данного маркера в 1-й группе ( $1,65 \pm 0,14$  фмоль/мл).

После курса стандартной терапии достоверных различий в содержании ЭТ-1 в крови у пациентов 1-й и 2-й группы по сравнению с исходными величинами не зарегистрировано.

Несомненно, повышение содержания ЭТ-1 в крови у больных с различной степенью тяжести ХОБЛ в период обострения и в стадии клинической стабилизации, установленное в ходе количественного анализа, косвенно может свидетельствовать об участии данного полипептида в патогенезе хронического воспаления. Однако более полную качественную характеристику роли системного ЭТ-1 в развитии ХОБЛ дают результаты корреляционного анализа. В частности, были исследованы ассоциации между уровнем ЭТ-1 в циркуляции и показателями легочной

функции (ОФВ<sub>1</sub>, ОФВ<sub>1</sub> / ФЖЕЛ, E<sub>вд</sub>). Наиболее тесные взаимосвязи установлены между содержанием ЭТ-1 в крови и E<sub>вд</sub> (1-я группа –  $r = -0,56$ ;  $p < 0,05$ ; 2-я группа –  $r = -0,34$ ;  $p < 0,05$ ), а также с ОФВ<sub>1</sub> (1-я группа –  $r = 0,47$ ;  $p < 0,05$ ) но во 2-й группе – ассоциации минимальны ( $r = 0,26$ ;  $p < 0,05$ ).

### Динамика концентрации NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub>

В ходе сравнительного исследования суммарной концентрации NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> в КВВ установлено достоверное повышение исходного уровня стабильных метаболитов NO у больных с обострением ХОБЛ II и III стадии (в 1,6 и 1,8 раза) по сравнению со здоровыми некурящими лицами ( $p < 0,05$ ), как показано на рис. 2. Отличительной особенностью динамики содержания NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> в КВВ у пациентов 1-й и 2-й групп на фоне стандартной терапии явилось статистически значимое снижение уровня изучаемых молекул до показателей здоровых некурящих добровольцев ( $5,92 \pm 1,03$  и  $6,11 \pm 1,14$  мкмоль/мл соответственно).

С целью уточнения роли NO в генезе нарушений легочной функции у больных ХОБЛ провели корреляционный анализ между суммарной концентрацией NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> в КВВ и показателями ФВД (ОФВ<sub>1</sub>, ОФВ<sub>1</sub> / ФЖЕЛ, E<sub>вд</sub>). Значимых ассоциаций между уровнем топических метаболитов NO, ОФВ<sub>1</sub> и ОФВ<sub>1</sub> / ФЖЕЛ не установлено. В то же время зарегистриро-

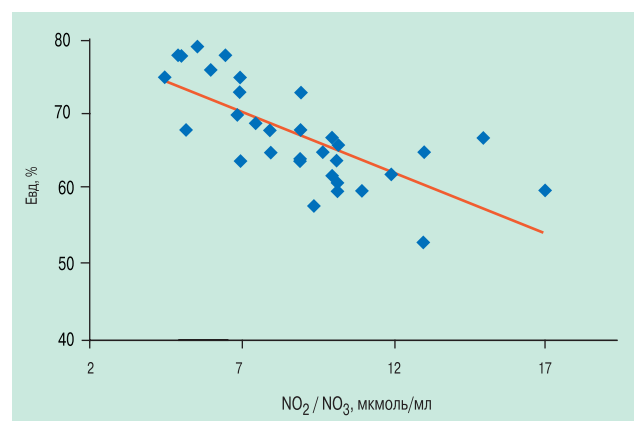


Рис. 3. Корреляции суммарной концентрации NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> в КВВ и E<sub>вд</sub> у больных с обострением ХОБЛ II стадии ( $r = -0,71$ )

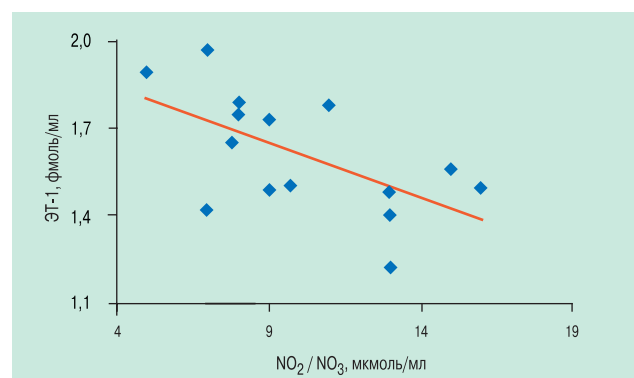


Рис. 4. Корреляции суммарной концентрации NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> в КВВ и содержания ЭТ-1 в крови у больных с обострением ХОБЛ II стадии ( $r = -0,59$ )

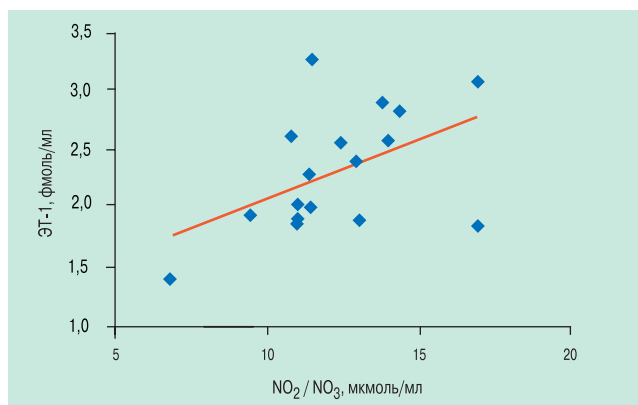


Рис. 5. Корреляционные связи суммарной концентрации  $\text{NO}_2 / \text{NO}_3$  в КВВ и содержания ЭТ-1 в крови у больных с обострением ХОБЛ III стадии ( $r = 0,49$ )

ваны сильные отрицательные связи между суммарной концентрацией  $\text{NO}_2 / \text{NO}_3$  в КВВ и  $E_{\text{вд}}$  (%) при обострении ХОБЛ II стадии ( $r = -0,74$ ;  $p < 0,01$ ), как показано на рис. 3, и умеренные негативные ассоциации при тяжелом течении заболевания ( $r = -0,55$ ;  $p < 0,05$ ).

В ходе корреляционного анализа содержания ЭТ-1 в крови и суммарной концентрации  $\text{NO}_2 / \text{NO}_3$  в КВВ у больных с обострением ХОБЛ II стадии выявлена отрицательная корреляция между исследуемыми маркерами ( $r = -0,59$ ;  $p < 0,05$ ; рис. 4). Однако у пациентов с тяжелым течением ХОБЛ, напротив, определялась позитивная взаимосвязь между системным уровнем ЭТ-1 и эндобронхиальными метаболитами NO ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,05$ ) (рис. 5).

## Обсуждение

Раннее выявление нарушений продукции активных провоспалительных медиаторов, таких как эндотелин-1 и NO, можно рассматривать в качестве нового направления в совершенствовании диагностики и, в конечном счете, оптимизации патогенетической терапии ХОБЛ.

В настоящем исследовании изучалось содержание ЭТ-1 в крови и концентрации метаболитов NO в КВВ у больных с обострением ХОБЛ II и III стадии до и после лечения. Было показано, что уровень ЭТ-1 в крови при обострении ХОБЛ повышался у всех пациентов. Кроме того, избыточное накопление ЭТ-1 было более выраженным у больных с тяжелым течением ХОБЛ, по сравнению с пациентами с умеренными обструктивными нарушениями. Полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследователей, которые выявили увеличение уровня ЭТ-1 в крови при ХОБЛ и более значительное — при наличии легочной артериальной гипертензии [3]. Интересно, что была обнаружена отрицательная корреляция между содержанием ЭТ-1 в крови и  $E_{\text{вд}}$  у всех больных и положительная — между уровнем циркулирующего ЭТ-1 и ОФВ<sub>1</sub> только при II стадии ХОБЛ. Эти данные могут подтверждать гипотезу о влиянии компонентов системного воспаления на поддержание структурных

и функциональных нарушений в респираторной системе.

Свидетельством повышения активности топического воспаления при обострении ХОБЛ служит выявленное достоверное увеличение суммарной концентрации  $\text{NO}_2 / \text{NO}_3$  в КВВ у обследованных больных, по сравнению с условно испытываемыми здоровыми лицами. При этом усиление нитрозольного стресса в респираторном тракте сочеталось со снижением бронхиальной проходимости и нарастанием гиперинфляции.

Избыточное накопление ЭТ-1 в крови и повышение суммарной концентрации  $\text{NO}_2 / \text{NO}_3$  в КВВ отличались разнонаправленностью взаимосвязей на разных стадиях ХОБЛ. При умеренных обструктивных нарушениях легочной функции у пациентов с обострением ХОБЛ регистрировались отрицательные ассоциации уровня вазоактивного полипептида (ЭТ-1) и маркеров нитрозольного стресса. Можно предположить, что избыточное высвобождение NO при II стадии ХОБЛ оказывает не только повреждающее действие, но имеет и противовоспалительную активность, что ограничивает продукцию ЭТ-1. Напротив, при ХОБЛ с тяжелой бронхообструкцией (ОФВ<sub>1</sub> < 50 %) корреляция между исследуемыми маркерами была положительной, что может свидетельствовать о совместном участии ЭТ-1 и NO в прогрессировании топического воспаления и ухудшении бронхиальной проходимости.

Как показали результаты исследования, стандартная терапия обострений ХОБЛ достоверно снижала до показателей нормы лишь уровень метаболитов NO в КВВ у всех обследованных пациентов, но не ЭТ-1 в крови. Эти данные позволяют рекомендовать определение суммарной концентрации  $\text{NO}_2 / \text{NO}_3$  в КВВ у больных ХОБЛ в динамике. Следует учитывать, что данный метод диагностики является неинвазивным и может использоваться неоднократно.

## Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании было показано, что обострение ХОБЛ у больных с ОФВ<sub>1</sub> < 70 % сопряжено с достоверным повышением содержания ЭТ-1 и суммарной концентрации стабильных метаболитов NO в КВВ.

Разнонаправленный характер корреляций уровня системного ЭТ-1 и продукции  $\text{NO}_2 / \text{NO}_3$  в бронхолегочной ткани при ХОБЛ средней и тяжелой степени позволяет предположить, что патогенетические пути прогрессирования воспаления и бронхиальной обструкции также различны.

Сохранение избыточного уровня ЭТ-1 в циркуляции в период клинической стабилизации у пациентов ХОБЛ служит основанием для разработки новых противовоспалительных препаратов.

## Литература

1. Mannino D.M., Buist S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765–773.

2. Siafakas N.M. COPD. Eur. Respir. Mon. 2006; 38: 1–482.
3. Carratu P., Scoditti C., Maniscalco M. et al. Exhaled and arterial levels of endothelin-1 are increased and correlate with pulmonary systolic pressure in COPD with pulmonary hypertension. BMC Pulm. Med. 2008; 5: 840–848.
4. Wort S.J., Woods M., Warner T.D. et al. Endogenously released endothelin-1 from human pulmonary artery smooth muscle promotes cellular proliferation: relevance to pathogenesis of pulmonary hypertension and vascular remodeling. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2001; 25 (1): 104–110.
5. Santos S., Peinado V.I., Ramirez J. et al. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. Eur. Respir. J. 2002; 19 (4): 632–638.
6. Wright J.L., Tai H., Chung A. Cigarette smoke induces persisting increases of vasoactive mediators in pulmonary arteries. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004; 31: 501–509.
7. Звягина Т.В. Метаболиты оксида азота в крови и моче здоровых людей: их связь с цитокинами и гормонами. Вестн. неотлож. и восстанов. мед. 2002; 3 (2): 302–304.
8. Климанов И.А. Изучение метаболизма оксида азота при бронхиальной астме: Дис. ... канд. мед. наук. М.; 2006.

#### Информация об авторах

Постникова Лариса Борисовна – д. м. н., доцент кафедры внутренних болезней Института ФСБ России; тел.: (831) 276-84-12; e-mail: plbreath@mail.ru

Кубышева Наиля Исаковна – к. б. н., врач-иммунолог детской городской клинической больницы № 27 "Айболит"; тел: (910) 796-98-38

Миндубаев Рамиль Зиннурович – клинический ординатор кафедры внутренних болезней Института ФСБ России; тел: (831) 276-84-12

Болдина Марина Викторовна – врач-пульмонолог городской больницы № 28; тел: (831) 276-84-12

Соодаева Светлана Келдибековна – д. м. н., проф., зав. лабораторией клинической и экспериментальной биофизики НИИ пульмонологии ФМБА России; тел.: (495) 465-52-64; e-mail: soodaeva@mail.ru

Поступила 16.10.09

© Коллектив авторов, 2010

УДК 616.24-036.12-07:616.233-008.8-074