

*В.А.Невзорова, Ю.В.Майстровская, И.В.Чкаловец,
К.В.Майстровский, Е.А.Кочеткова*

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА,
 α_1 -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА И ЕГО ГЛИКОФОРМ В КОНДЕНСАТАХ
ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

Владивостокский государственный медицинский университет

INVESTIGATION OF NITRIC OXIDE METABOLITES AND α_1 -ACID GLYCOPROTEIN
WITH ITS GLYCOFORMS IN EXHALED BREATH CONDENSATE
OF BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

V.A.Nevzorova, Yu.V.Maistrovskaya, I.V.Chkalovets, K.V.Maistrovsky, E.A.Kochetkova

Summary

The aim of this study was to evaluate nitric oxide (NO) and α_1 -acid glycoprotein (AGP) with its glycoforms as biochemical markers of inflammatory activity in the airways of bronchial asthma (BA) patients. We examined expired breath condensate (EBC) samples of 132 patients with severe (32) and moderate (30) BA and 30 healthy non-smoking volunteers using spectrophotometry to study NO metabolites and immunoassay to study AGP. The EBC NO metabolites levels were found to increase significantly in BA exacerbation depending on its severity. In stable BA patients the NO metabolites levels decreased but they were higher in severe and moderate BA than in healthy volunteers. The highest AGP concentration was measured in BA exacerbation with the maximal values in severe disease. In stable BA the AGP level decreased in all BA groups but it remained higher than in healthy volunteers. The qualitative structure of AGP changed during the BA exacerbation, especially in severe cases. So, according to our results the NO metabolites, AGP and its glycoforms reflect the airway inflammatory activity and can be applied to control the disease.

Резюме

С целью оценки возможности использования метаболитов оксида азота (NO), белка острой фазы α_1 -кислого гликопротеина (АКГ) и его гликоформ в качестве биохимических маркеров для определения активности воспаления при бронхиальной астме (БА) были обследованы конденсаты выдыхаемого воздуха (КВВ) 132 больных с разной степенью тяжести заболевания в стадии обострения и ремиссии при использовании различных лечебных программ. Наши исследования показали, что уровень метаболитов NO в КВВ больных БА значительно возрастает в период обострения параллельно тяжести приступа. В ремиссию БА содержание метаболитов NO в КВВ снижается, но остается повышенным при тяжелом и среднетяжелом течении астмы с наиболее высокой концентрацией при отсутствии регулярного применения базисной противовоспалительной терапии. Содержание АКГ в КВВ повышается при обострении БА, снижается в период ремиссии, но остается выше, чем у здоровых, при тяжелом и среднетяжелом течении астмы. Установлено, что при обострении БА меняется качественный состав АКГ с повышением содержания всех его гликоформ. Таким образом, определение метаболитов NO, АКГ и его гликоформ в КВВ пациентов с БА является чувствительным методом диагностики степени тяжести и фазы заболевания, широкое внедрение которого в клиническую практику позволит максимально оптимизировать программы лечения.

Прогнозирование течения бронхиальной астмы (БА), выбор программы лечения во многом определяются активностью воспаления в дыхательных путях, для контроля которого до сих пор отсутствуют надежные и информативные критерии. С целью совершенствования диагностических и лечебных возможностей при БА в настоящее время ведется активный поиск биологических маркеров, позволяющих достаточно полно оценивать активность воспалительного процесса.

По данным современной литературы, в качестве одного из таких маркеров может рассматриваться оксид азота (NO) — простейшее химическое вещество, которое является одним из важнейших биологических медиаторов человека, непрерывно продуцируемое большинством тканей организма [2,4].

Представляет интерес изучение возможности использования белка острой фазы α -кислого гликопротеина (АКГ) для оценки активности воспаления при

больных БА имеет место повреждение целостности эпителиальной выстилки, которое может еще более усугубляться под воздействием высоких доз NO [4].

В ремиссию болезни уровень нитрит-иона в КВВ снижается по сравнению с обострением заболевания, но остается выше, чем в группе контроля, при тяжелом ($2,7 \pm 0,51$ и $1,3 \pm 0,35$ нмоль/мл; $p < 0,05$) и среднетяжелом ($2,4 \pm 0,68$ и $1,3 \pm 0,35$ нмоль/мл; $p < 0,05$) течении БА. Уровень метаболита NO в КВВ больных БА легкой степени практически не отличается от показателей группы контроля ($1,6 \pm 0,32$ и $1,3 \pm 0,35$ нмоль/мл; $p > 0,01$).

Согласно полученным данным, применение противовоспалительных препаратов при БА может влиять на содержание нитрит-иона в КВВ.

Наши исследования показали более выраженное снижение содержания NO в КВВ пациентов, получавших сочетание ингаляционных и системных ГКС для купирования приступа средней степени тяжести, и у пациентов, получавших сочетание системных ГКС для парентерального введения и перорального приема, по сравнению с больными, для лечения которых использовались только системные ГКС для парентерального введения ($3,1 \pm 0,63$ и $5,1 \pm 0,36$ нмоль/мл; $p < 0,05$) и ($3,5 \pm 0,41$ и $5,1 \pm 0,36$ нмоль/мл; $p < 0,05$) соответственно. Вероятно, это связано с более адекватной дозировкой ГКС, достигаемой в организме при применении сочетанной комбинации препаратов, а с другой стороны, доставкой препарата непосредственно в дыхательные пути при использовании топических ГКС.

Несмотря на усиление NO-продуцирующей функции легких у больных БА и в ремиссию болезни, у пациентов с тяжелой астмой, принимающих в качестве

базисной терапии ГКС, уровень нитрит-иона в КВВ значительно ниже, чем у не имеющих ее ($2,03 \pm 0,22$ и $2,8 \pm 0,26$ нмоль/мл; $p < 0,05$) (табл.2). Причем отсутствует достоверная разница в содержании метаболита NO в КВВ больных БА тяжелой степени, принимающих системные ГКС и использующих их ингаляционную форму ($2,03 \pm 0,61$ и $2,1 \pm 0,34$ нмоль/мл; $p > 0,01$) (см. табл.2).

У пациентов со среднетяжелой астмой, использующих ГКС, концентрация нитрит-иона соответствует показателю контрольной группы ($1,6 \pm 0,24$ и $1,3 \pm 0,35$ нмоль/мл; $p > 0,05$), в то время как у не получающих базисную терапию превышает его в 2 раза ($2,7 \pm 0,21$ и $1,3 \pm 0,35$ нмоль/мл; $p < 0,05$). Также не выявлено достоверных различий в концентрации метаболита NO в КВВ пациентов, принимающих различные топические формы ГКС, а именно флутиказона пропионат и беклометазона дипропионат ($1,5 \pm 0,21$ и $1,6 \pm 0,24$ нмоль/мл соответственно, $p > 0,01$).

Выраженное ингибирующее влияние ГКС на секрецию NO в дыхательных путях больных БА может быть обусловлено их способностью тормозить все фазы аллергического ответа, активировать апоптоз эффекторных клеток, подавлять синтез ИЛ-1, ИЛ-5, ФНО α , снижать экспрессию адгезивных молекул [7].

В группах больных среднетяжелой БА, получающих кромогликат и недокромил натрия, уровень нитрит-иона в КВВ не различается (см. табл.2) и достоверно ниже, чем у пациентов, не использующих базисную терапию ($2,2 \pm 0,11$ и $2,7 \pm 0,21$ нмоль/мл; $p < 0,05$). Вероятно, это обусловлено способностью кромогликата и недокромилла натрия предотвращать как раннюю, так и позднюю фазу аллергического от-

Таблица 2

Содержание метаболитов NO и АКГ в КВВ пациентов БА разной степени тяжести при использовании различных программ базисной терапии

Препарат	Показатели содержания метаболита NO и АКГ					
	БА тяжелой степени (n=18)		БА средней степени тяжести (n=32)		БА легкой степени (n=17)	
	нитрит-ион, нмоль/мл	АКГ, нг/мл	нитрит-ион, нмоль/мл	АКГ, нг/мл	нитрит-ион, нмоль/мл	АКГ, нг/мл
Кромогликат натрия	$1,6 \pm 0,43$ $p > 0,05$	$11,2 \pm 0,23$	$2,2 \pm 0,11^*$	$11,8 \pm 0,16^*$	—	—
Недокромил натрия	$1,5 \pm 0,24$	$10,8 \pm 0,61$	$2,1 \pm 0,19^*$	$11,1 \pm 0,41^*$	—	—
Флутиказона пропионат	—	—	$1,5 \pm 0,21$	$13,01 \pm 0,14^*$	—	—
Беклометазона дипропионат	—	—	$1,6 \pm 0,24$	$12,9 \pm 0,23^*$	$2,1 \pm 0,34^*$	$14,3 \pm 0,51^*$
Системные ГКС					$2,1 \pm 0,21^*$	$14,1 \pm 0,38^*$
Показатели в среднем по группе	$1,6 \pm 0,35$ $p > 0,05$	$11,4 \pm 0,36$	$2,4 \pm 0,38^*$	$12,5 \pm 0,9^*$	$2,7 \pm 0,51^*$	$13,4 \pm 1,09^*$
Контроль, n=30	Нитрит-ион, нмоль/мл $1,3 \pm 0,35$				АКГ, нг/мл $9,3 \pm 1,3$	

вета и тормозить активацию клеток воспаления через систему цитокинов.

Из вышеизложенного следует, что содержание метаболита NO в КВВ достаточно точно отражает степень активности воспаления в дыхательных путях и эффективность проводимой терапии при БА.

Секреция эффекторными клетками воспаления при БА ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α приводит к активации синтеза АКГ альвеолоцитами 2-го порядка [10].

Повышение АКГ в сыворотке крови при воспалительных заболеваниях уже давно установлено и используется как диагностический критерий многих патологических состояний [13]. В то же время его исследование в других средах организма практически не проводилось.

Нами впервые выявлено наличие АКГ в КВВ как у здоровых, так и больных БА. Уровень АКГ в КВВ контрольной группы составил $9,3 \pm 1,3$ нг/мл.

Содержание АКГ у больных БА значительно варьирует в зависимости от фазы, тяжести течения болезни и используемой программы лечения. Так, в период обострения астмы уровень белка возрастает с тяжестью приступа и при тяжелом и среднетяжелом течении превышает показатели содержания АКГ в КВВ контрольной группы более чем в 2 и 1,5 раза ($18,6 \pm 3,1$; $9,5 \pm 1,3$; $15,2 \pm 0,87$ и $9,5 \pm 1,3$ нг/мл соответственно; $p < 0,05$). В ремиссию астмы концентрация АКГ снижается по сравнению с обострением заболевания, но остается повышенной при тяжелой и средней степени БА (см. табл.1).

Возможно, повышение АКГ в период обострения болезни и при недостаточно контролируемом ее течении может быть связано с индуцибельной экспрессией иРНК АКГ в ответ на сохраняющееся присутствие провоспалительных цитокинов и направлено на ограничение воспалительного процесса [10].

По данным *B.Crestani и соавт.* [10], на синтез АКГ в большей степени, чем цитокины, влияют ГКС, что подтверждается и результатами наших исследований. Использование ГКС для купирования приступа сопровождается увеличением концентрации белка в КВВ. Так, при применении сочетания системных и топических ГКС уровень АКГ в КВВ при среднетяжелом течении приступа БА возрастает до $19,4 \pm 0,48$ нг/мл.

Нами также отмечено, что уровень АКГ нарастает более значительно у пациентов, получающих ГКС в качестве базисной терапии. У пациентов с тяжелым и среднетяжелым течением БА, получавших в ремиссию базисную терапию системными и ингаляционными ГКС, при приступе тяжелой и средней степени тяжести уровень АКГ в КВВ выше, чем у пациентов, не использующих ее (соответственно $18,8 \pm 0,26$ и $17,4 \pm 0,31$ нг/мл, $p < 0,05$; $16,1 \pm 0,21$ и $13,9 \pm 0,43$ нг/мл, $p < 0,05$).

В ремиссию астмы содержание белка также достоверно выше у пациентов, использующих в программе лечения ГКС (см. табл.2). Так, у пациентов с тяжелым течением астмы, получающих системные или ингаляционные ГКС, уровень АКГ в КВВ достоверно выше, чем у не получающих базисную терапию ($14,3 \pm 0,51$ и $12,5 \pm 0,21$ нг/мл; $p < 0,05$). При этом форма приема ГКС не оказывает влияния на его содержание, а именно, в группе пациентов, принимающих ГКС *per os*, его уровень составил $14,1 \pm 0,38$ нг/мл, а у больных с ингаляционным введением ГКС — $14,3 \pm 0,51$ нг/мл, что достоверно не различается ($p > 0,05$).

В группе больных со среднетяжелым течением БА наиболее высокий уровень АКГ в КВВ наблюдается у пациентов, использующих ингаляционные ГКС ($13,1 \pm 0,14$ и $9,5 \pm 1,3$ нг/мл; $p < 0,05$).

Содержание белка в КВВ у больных, применяющих кромогликат натрия, достоверно ниже показателей больных, применяющих ГКС ($11,1 \pm 0,41$; $12,9 \pm 0,23$; $3,66 \pm 0,2$ и $2,69 \pm 0,15$ нг/мл при $p < 0,05$). Это, возможно, связано с отсутствием способности у данных лекарственных препаратов индуцировать секрецию АКГ, а также со слабой экспрессией провоспалительных цитокинов.

Анализ уровня АКГ в группе пациентов с легкой степенью БА не выявил достоверных различий между пациентами, получающими и не получающими базисную терапию ($11,1 \pm 0,44$ и $10,8 \pm 0,61$ нг/мл; $p > 0,05$).

Согласно данным многих авторов, при возникновении различных заболеваний меняется не только количественное содержание АКГ, но и его качественный состав, что обусловлено значительной микрорегетерогенностью белка [13].

Таблица 3

Соотношение гликоформ α_1 -кислого гликопротеина в КВВ больных БА в период обострения

Показатель соотношения	Контроль (n=30)	Тяжесть приступа БА		
		тяжелой степени (n=12)	средней степени (n=34)	легкой степени (n=19)
SGL/АКГ	$4,22 \pm 0,2$	$15,9 \pm 0,55^*$	$8,8 \pm 0,75^*$	$3,8 \pm 0,46$
CGL/АКГ	$3,9 \pm 0,87$	$13,9 \pm 1,75^*$	$11,9 \pm 0,91^*$	$6,6 \pm 0,72^*$
DTL/АКГ	$4,24 \pm 0,51^*$	$8,9 \pm 0,64^*$	$6,7 \pm 0,29^*$	$3,9 \pm 0,2$

Соотношение гликоформ α_1 -кислого гликопротеина в КВВ больных БА разной степени тяжести в период ремиссии

Показатель соотношения	Контроль (n=30)	Степень БА		
		тяжелая (n=17)	средняя (n=32)	легкая (n=18)
SJL/АКГ	4,22±0,2	5,5±0,67	4,6±,62	4,9±0,36
CGL/АКГ	3,9±0,2	9,9±0,34*	7,2±0,41*	6,7±0,16*
DTL/АКГ	4,24±0,51	5,2±0,24	4,4±0,47	3,89±0,21

Проведенное нами с помощью специфических лектинов исследование гликоформ белка в разные фазы БА [8,9] выявило изменение их соотношения в зависимости от периода заболевания и проводимой терапии. В табл.3 и 4 приведены доли лектин-реактивных гликоформ, отнесенных к концентрации АКГ в КВВ, в относительных единицах при обострении и ремиссии БА.

Так, концентрация гликоформ, содержащих терминальные остатки галактоз (CGL-реактивных гликоформ) увеличивается при обострении астмы (см. табл.3). При этом ее повышение одновременно с нарастанием общего уровня белка происходит параллельно тяжести приступа, превышая показатели контрольной группы соответственно в 1,5, 2 раза и даже более чем 3 раза при легком, среднетяжелом и тяжелом приступе.

Диссоциация в соотношении гликоформ, содержащих терминальные остатки глюкозамина и высокомолекулярный тип углеводных цепей в стадию обострения, выражена не столь значительно и проявляется

только при тяжелом и среднетяжелом течении приступа (см. табл.3), а в период ремиссии их содержание не отличается от показателей контрольных групп (см. табл.4). В ремиссию БА содержание CGL-реактивных гликоформ остается повышенным при всех вариантах течения болезни (см. табл.4).

В отличие от концентрации АКГ применение различных комбинаций ГКС для купирования приступа существенно не влияет на его качественный состав. Так, соотношение всех трех исследуемых гликоформ достоверно не отличается в группах больных при использовании в их лечебных программах сочетания системных и ингаляционных форм или ГКС для перорального и парентерального введения, а также ГКС только для парентерального введения.

В период ремиссии тяжелой и среднетяжелой астмы под влиянием лечебной программы изменяется лишь концентрация гликоформы, содержащей терминальные остатки галактоз (табл.5). Ее уровень повышен только у пациентов, принимающих ГКС, а при использовании кромогликата или недокромила нат-

Соотношение гликоформ АКГ в КВВ пациентов БА разной степени тяжести при использовании различных программ базисной терапии

Соотношение гликоформ АКГ	БА легкой степени тяжести (n=18)			БА средней степени тяжести (n=32)			БА тяжелой степени (n=17)		
	SGL/AAG	CGL/AAG	DTL/AAG	SGL/AAG	CGL/AAG	DTL/AAG	SGL/AAG	CGL/AAG	DTL/AAG
Кромогликат натрия	4,6±0,34	5,8±0,72	3,6±0,45	4,3±0,91	7,0±0,15*	4,2±0,52	-	-	-
Недокромил натрия	4,6±0,28	6,4±0,43	3,5±0,31	4,3±0,27	6,9±0,2*	4,2±0,21	-	-	-
Флутиказона пропионат	-	-	-	4,8±0,21	7,7±0,32*	4,5±0,33	-	-	-
Беклометазона дипропионат	-	-	-	4,7±0,68	7,8±0,29*	4,4±0,24	5,6±0,34	10,3±0,26	5,4±0,43
Системные ГКС	-	-	-	-	-	-	5,5±0,54	10,4±0,21	5,5±0,61
Показатели в среднем по группе	4,9±0,36	6,7±0,16	3,8±0,21	4,6±0,62	7,2±0,41	4,4±0,47	5,5±0,67	9,9±0,34	5,2±0,24
Контроль (n=30)	4,22±0,2	3,9±0,2	4,2±0,51	4,22±0,2	3,9±0,2	4,2±0,51	4,22±0,2	3,9±0,2	4,2±0,51

рия достоверно не отличается от показателей здоровых добровольцев.

Вероятно, вариабельность содержания CGL-реактивных гликоформ обусловлена их более высокой чувствительностью к факторам, отвечающим за реализацию воспаления при БА, а также к ГКС.

Итак, наши исследования показали, что содержание метаболита NO, АКГ и его гликоформ в КВВ больных БА зависит от тяжести течения, периода болезни и используемой противовоспалительной терапии. Таким образом, исследование NO-продуцирующей функции легких и содержания АКГ с оценкой его микрогетерогенности может быть использовано для мониторинга активности воспалительного процесса при БА и выбора наиболее оптимизированной программы лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бронхиальная астма. Глобальная стратегия. Совместный доклад Национального института Сердце, Легкие, Кровь и Всемирной организации здравоохранения. Пульмонология 1996; Прил.: 1-165.
2. Вознесенский Н.А., Чучалин А.Г., Антонов Н.С. Окись азота и легкие. Там же 1998; 2: 6-10.
3. Гельцер Б.И., Кривенко Л.Е., Невзорова В.А., Лукьянов П.А. Респираторное влаговыведение и значение его исследования в пульмонологии. Тер. архив 2000; 72 (3): 46-50.

4. Малышев И.Ю. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма. Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 1997; 1: 49-55.
5. Невзорова В.А., Зуга М.В., Гельцер Б.И. Роль окиси азота в регуляции легочных функций. Тер. арх. 1997; 3: 68-72.
6. Barnes P.G. Nitric oxide and airway disease. Ann. Med. 1995; 27 (3): 389-393.
7. Barnes P.G. Mechanisms of action of glucocorticosteroids in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 154: 21-27.
8. Belogorsteva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.V. et al. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal specific lectin from sea mussel *Crenomytilus Grayanus*. Comp. Biochem. Physiol. 1998; 119C (1): 45-50.
9. Belogorsteva N.I., Molchanova V.I., Glasunov V. et al. N-Acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum*. Biochim. Biophys. Acta. 1998; 1380: 249-256.
10. Crestani B., Rolland C., Lardeux B. Inducible expression of the α_1 -Acid glycoprotein by rat and human Type 2 alveolar epithelial cells. J. Immunol. 1998; 160: 4596-4605.
11. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] Nitrate in biological fluids. Analyt. Biochem. 1982; 126: 131-138.
12. Engvall T. Enzyme — immunoassay ELISA and EMIT. Meth. Enzymol. 1980; 70: 419-439.
13. Kremer J.M.H., Wilting J. Drug binding to human α_1 -acid glycoprotein in health and disease. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1988; 40 (1): 1-47.

Поступила 06.05.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК 616.248-053.2-036.2

Е.Г.Кондюрина, Т.Н.Елкина, А.В.Лиханов, Т.В.Карцева

ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ В НОВОСИБИРСКЕ

Новосибирская государственная медицинская академия

DYNAMICS OF CHILD'S BRONCHIAL ASTHMA SPREAD IN NOVOSIBIRSK

E.G.Kondiurina, T.N.Elkina, A.V.Likhanov, T.V.Kartseva

Summary

Six-year dynamics of epidemiology of bronchial asthma was analyzed in Novosibirsk according to a common standardized protocol of the "International Study of Asthma and Allergic Diseases in Children" (ISAAC) programme. The pathology spread was studied using a total surveying among first-form and eight-form pupils (the survey involved 7291 pupils 1996, 6631 ones in 1999 and 6943 children in 2002). The results showed stable spread of bronchial asthma symptoms among the senior and junior pupils and prevalence of mild asthma with rare exacerbations in both the groups. A progredient growth of severe asthma attack rate was noted in eight-form pupils. An increase in frequency of combined upper and lower airway pathologies was registered with reduction in skin atopy rate. A problem of underestimating of the pathology was discussed.

Резюме

Исследована 6-летняя динамика эпидемиологии бронхиальной астмы по единым стандартизованным протоколам программы "Международное исследование астмы и аллергических заболеваний у детей" (ISAAC) в Новосибирске. Изучение распространенности патологии проводилось при сплошном